

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

dem Institut für Anatomie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

# **Die Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 bei der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Conny Hunger,  
aus Karl-Marx-Stadt,  
jetzt Chemnitz

Leipzig, 2013

---

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Dekan:** Prof. Dr. med. vet. habil. Uwe Truyen

**Betreuer:** Prof. Dr. med. vet. habil. Johannes Seeger  
Prof. Dr. rer. biol. hum. Jürgen Engele

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. vet. habil. Johannes Seeger  
Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig  
Prof. Dr. rer. biol. hum. Jürgen Engele  
Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät der Universität  
Leipzig
2. Prof. Dr.med. vet. Dr. med. Dr. med. habil. Fred Sinowatz  
Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie,  
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Tag der Verteidigung:** 22.01.2013

---

Meinem Opa Max

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                | <b>vii</b> |
| <b>1 Einleitung</b>                                                                         | <b>1</b>   |
| <b>2 Literaturübersicht</b>                                                                 | <b>3</b>   |
| 2.1 Entwicklung der Extremitätenmuskulatur . . . . .                                        | 3          |
| 2.1.1 Embryonale Entwicklung der Muskulatur . . . . .                                       | 3          |
| 2.1.2 Regulation der Muskelentwicklung . . . . .                                            | 4          |
| 2.2 Chemokine . . . . .                                                                     | 7          |
| 2.2.1 Die Funktionen von CXCR4 und CXCR7 . . . . .                                          | 9          |
| 2.2.2 Chemokine bei der Muskelregeneration . . . . .                                        | 11         |
| 2.3 Duchenne'sche Muskelerkrankung . . . . .                                                | 13         |
| 2.3.1 Ein Tiermodell: Die mdx-Maus . . . . .                                                | 13         |
| 2.4 C2C12-Zellen . . . . .                                                                  | 14         |
| <b>3 Material und Methoden</b>                                                              | <b>15</b>  |
| 3.1 Tiere . . . . .                                                                         | 15         |
| 3.2 Material . . . . .                                                                      | 15         |
| 3.2.1 Chemikalien . . . . .                                                                 | 15         |
| 3.2.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .                                                       | 16         |
| 3.2.3 Medien/Medienzusätze/Transfektion . . . . .                                           | 17         |
| 3.2.4 Geräte . . . . .                                                                      | 17         |
| 3.2.5 PCR/Sonstiges . . . . .                                                               | 18         |
| 3.2.6 Antikörper . . . . .                                                                  | 18         |
| 3.3 Methoden . . . . .                                                                      | 19         |
| 3.3.1 C2C12-Zellen - Aufbewahrung und Kultivierung . . . . .                                | 19         |
| 3.3.2 Differenzierung und Versuchsanordnung . . . . .                                       | 20         |
| 3.3.3 Transfektion von C2C12-Zellen . . . . .                                               | 21         |
| 3.3.4 Westernblot . . . . .                                                                 | 22         |
| 3.3.5 Ko-Immunpräzipitation . . . . .                                                       | 27         |
| 3.3.6 Durchflusszytometrie (engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting oder FACS) . . . . . | 28         |
| 3.3.7 Immunzytochemische Färbungen von C2C12-Zellen . . . . .                               | 31         |
| 3.3.8 Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten . . . . .                          | 32         |
| 3.3.9 PCR . . . . .                                                                         | 33         |
| 3.3.10 Statistische Analyse . . . . .                                                       | 35         |



|          |                                                                                                          |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                        | <b>37</b> |
| 4.1      | Analyse der Muskulatur während der Entwicklung . . . . .                                                 | 37        |
| 4.1.1    | Immunhistochemie . . . . .                                                                               | 37        |
| 4.1.2    | Westernblot . . . . .                                                                                    | 40        |
| 4.1.3    | PCR . . . . .                                                                                            | 41        |
| 4.2      | C2C12-Zellen als Modellsystem für Proliferation und Differenzierung . . . .                              | 42        |
| 4.2.1    | Kontrolle der C2C12-Zellaktivität . . . . .                                                              | 42        |
| 4.2.2    | Expressionsanalyse von CXCR4 und CXCR7 in proliferierenden und<br>differenzierten C2C12-Zellen . . . . . | 43        |
| 4.2.3    | Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 und CXCR7 mit<br>Hilfe der FACS . . . . .                    | 47        |
| 4.2.4    | Immunpräzipitation . . . . .                                                                             | 48        |
| 4.3      | Funktion von CXCR4 und CXCR7 . . . . .                                                                   | 49        |
| 4.3.1    | Hemmender Einfluß von SDF-1 $\alpha$ auf C2C12-Zellen . . . . .                                          | 49        |
| 4.3.2    | Die Wirkung von Blockern auf die Differenzierung . . . . .                                               | 51        |
| 4.3.3    | siRNA-Transfektion der C2C12-Zellen . . . . .                                                            | 54        |
| 4.4      | Die Signalwege . . . . .                                                                                 | 58        |
| 4.4.1    | CXCR4 vermittelt SDF-1 $\alpha$ -induzierte Signale . . . . .                                            | 58        |
| 4.4.2    | Der MAP-Kinase-Signalweg im Zeitverlauf . . . . .                                                        | 60        |
| 4.5      | CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$ in der mdx-Maus . . . . .                                                | 63        |
| 4.5.1    | Westernblot . . . . .                                                                                    | 63        |
| 4.5.2    | Immunhistochemie . . . . .                                                                               | 64        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                        | <b>67</b> |
| 5.1      | CXCR4- und CXCR7-Expression <i>in vivo</i> . . . . .                                                     | 67        |
| 5.2      | C2C12-Zellen als Modellsystem für Proliferation und Differenzierung . . . .                              | 69        |
| 5.2.1    | CXCR4 und CXCR7 . . . . .                                                                                | 69        |
| 5.2.2    | SDF-1 $\alpha$ hemmt die Zelldifferenzierung . . . . .                                                   | 70        |
| 5.2.3    | SDF-1 $\alpha$ hemmt die Differenzierung der C2C12-Zellen über den CXCR4                                 | 71        |
| 5.2.4    | Die Signalwege geben den Hinweis auf die Funktion des CXCR7 . .                                          | 73        |
| 5.3      | CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$ in der mdx-Maus . . . . .                                                | 75        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                   | <b>77</b> |
| <b>7</b> | <b>Summary</b>                                                                                           | <b>79</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                              | <b>81</b> |

|                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| <b>A Anhang</b>                               | <b>93</b>  |
| A.1 Daten zur Quantitativen Analyse . . . . . | 93         |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>                  | <b>99</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>                    | <b>101</b> |
| <b>Danksagung</b>                             | <b>104</b> |



# Abkürzungsverzeichnis

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| <b>APS</b>   | Ammoniumperoxodisulfat               |
| <b>bp</b>    | Basenpaar                            |
| <b>BSA</b>   | bovines Serumalbumin                 |
| <b>Da</b>    | Dalton                               |
| <b>DAB</b>   | 3,3'-Diaminobenzidin                 |
| <b>DAPI</b>  | 4',6-Diamidin-2'-phenylindol         |
| <b>dest.</b> | destilliert                          |
| <b>DMEM</b>  | Dulbecco's Modified Eagle Medium     |
| <b>DMSO</b>  | Dimethylsulfoxid                     |
| <b>DNA</b>   | Desoxyribonukleinsäure               |
| <b>dNTP</b>  | 2'-Desoxyribonukleosid-5'triphosphat |
| <b>ECL</b>   | Enhanced Chemiluminescence           |
| <b>EDTA</b>  | Ethylendiamintetraessigsäure         |
| <b>FACS</b>  | fluoreszenzce activated cell sorter  |
| <b>FCS</b>   | fötales Kälberserum                  |
| <b>g</b>     | Gramm                                |
| <b>h</b>     | Stunde                               |
| <b>HCL</b>   | Salzsäure                            |
| <b>IHC</b>   | Immunhistochemie                     |
| <b>k</b>     | Kilo-                                |
| <b>kb</b>    | Kilobasenpaar                        |
| <b>l</b>     | Liter                                |
| <b>M</b>     | molar                                |
| <b>m</b>     | Milli-                               |
| <b>MAPK</b>  | mitogen aktivierte Proteinkinase     |
| <b>mdx</b>   | muscular dystrophy x                 |
| <b>min</b>   | Minute(n)                            |
| <b>MRF</b>   | Myogenic Regulatory Factor           |
| <b>mRNA</b>  | messenger RNA                        |
| <b>PAGE</b>  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese      |
| <b>PBS</b>   | phosphatgepufferte Salzlösung        |
| <b>PCR</b>   | polymerase chain reaction            |
| <b>PFA</b>   | Paraformaldehyd                      |
| <b>PKC</b>   | Proteinkinase C                      |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

|                 |                                                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PonceauS</b> | 3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphtalindisulfonsäure |
| <b>RNA</b>      | Ribonukleinsäure                                                              |
| <b>SDS</b>      | Natriumdodecylsulfat                                                          |
| <b>siRNA</b>    | small interfering RNA                                                         |
| <b>TAE</b>      | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                                                       |
| <b>TBS</b>      | Tris-gepufferte Salzlösung                                                    |
| <b>TEMED</b>    | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                                            |
| <b>Tris</b>     | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                                                |
| <b>UV</b>       | Ultraviolett                                                                  |
| <b>V</b>        | Volt                                                                          |
| <b>WB</b>       | Westernblot                                                                   |

# 1 Einleitung

Das CXC-Chemokine SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 ist an einer Vielzahl biologischer Mechanismen beteiligt. So kontrolliert es die Entwicklung des hämatopoetischen und des kardiovaskulären Systems ebenso, wie die Morphogenese des Gehirns. Bisher wurde angenommen, dass SDF-1 $\alpha$  seine Funktionen ausschließlich über CXCR4 vermittelt. Nach detaillierteren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass es ebenso an den früheren Waisenrezeptor RDC-1 bindet, welcher dadurch in CXCR7 umbenannt wurde. Dieser besitzt eine deutlich höhere Affinität für SDF-1 $\alpha$  und ist zusätzlich in der Lage interferon-inducible T cell  $\alpha$ -chemoattractant (I-TAC) zu binden. Der gegenwärtige Wissensstand zeigt, dass CXCR7 abhängig vom Zelltyp und der biologischen Gegebenheit unterschiedliche Funktionen ausübt. So wirkt er einerseits als Scavenger Chemokinrezeptor in der Entwicklung und kontrolliert die CXCR4-vermittelte Wanderung von primordialen Keimzellen, indem er den extrazellulären SDF-1 $\alpha$ -Gradienten moduliert. Andererseits zeigte sich in HEK-293 Zellen, dass CXCR7 gemeinsam mit CXCR4, Heterodimere bildet und somit dessen Signalverhalten aktiv beeinflusst. Darüber hinaus ist CXCR7 in verschiedenen Tumorzelllinien, aber auch in primären Astrozyten und Gliazellen fähig, aktiv SDF-1 $\alpha$ -induzierte Signale zu vermitteln. Dies geschieht sowohl über den klassischen G-Protein-gekoppelten Signalweg, als auch über  $\beta$ -Arrestin-abhängige Mechanismen.

In dieser Arbeit steht die Funktion beider Rezeptoren während der Entwicklung der Gliedmaßenmuskulatur im Vordergrund. Diese wird initiiert durch die Delamination der Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom, dem dorsalen Anteil der Somiten, und deren folgende Wanderung in die Extremitätenknospen. In der Gliedmaßenanlage treten die Vorläuferzellen in die myogene Entwicklungslinie ein und beginnen die myogenen Regulationsfaktoren (MRF) MyoD, Myf5, Myogenin und MRF4 zu exprimieren. Anschließend kommt es zur Bildung von Muskelfasern. In der Maus werden die primären Muskelfasern bereits am 11. Embryonaltag gebildet. Danach erfolgt das Muskelwachstum durch die Bildung zusätzlicher sekundärer Muskelfasern. Erste Anzeichen für eine Beteiligung des SDF-1 $\alpha$ -Systems an der Muskelentwicklung ergaben sich bei Untersuchungen an Mäusen, deren CXCR4 pharmakologisch oder genetisch inaktiviert wurde. Sie zeigten eine reduzierte Anzahl wandernder Muskelvorläuferzellen. Umfangreiche Untersuchungen von ÖDEMIS et al. (2005) an CXCR4 Knockoutmäusen bewiesen, dass Migrationsdefekte im Laufe der Entwicklung kompensiert werden, doch zusätzlich eine massive Reduktion der Muskelmasse in der späteren embryonalen Entwicklung auftritt. Weiterhin ist bekannt, dass SDF-1 $\alpha$  einerseits die Myoblastenproliferation induziert, deren Differenzierung jedoch hemmt und darüber hinaus mit Hilfe des CXCR4 die Anordnung von Myoblasten kontrolliert, welche eine mutmaßliche Voraussetzung für die Formation von Muskelfasern darstellt. Ob und in wie fern der CXCR7 in diese Differenzierungsprozesse involviert sein könnte, ist weitgehend unbekannt. Deshalb war das erste Ziel dieser Arbeit die Untersuchung des

## 1. EINLEITUNG

---

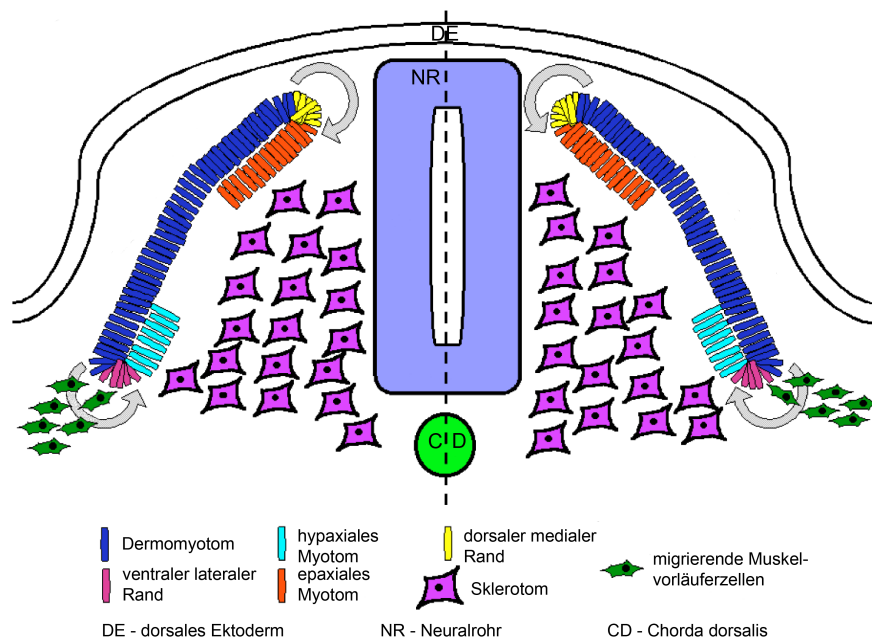
Expressions-musters beider Rezeptoren im Verlauf der Muskelentwicklung. Anschließend sollte die spezifische Rolle eines jeden Rezeptors und deren Signalverhalten während der Differenzierung mit Hilfe der C2C12-Zelllinie charakterisiert werden. Zum Schluss erfolgte die Untersuchung regenerativer Muskultur am mdx-Mausmodell um Ansätze für neue therapeutische Ziele zu finden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Entwicklung der Extremitätenmuskulatur

#### 2.1.1 Embryonale Entwicklung der Muskulatur

Die links und rechts der Chorda dorsalis und des Neuralrohres angeordneten Somiten („Urwirbel“), bilden den Ursprung der Muskulatur. Diese anfangs multipotenten Zellen differenzieren sich im Laufe der embryonalen Entwicklung zu Knorpel, Haut, Endothel, Bindegewebe, glatter Muskulatur und der Skelettmuskulatur (CHRIST und ORDAHL 1995). Während des Entwicklungsprozesses kommt es zur Unterteilung der Somiten in ventrale mesenchymale Sklerotome und die dorsal gelegenen epithelialen Dermomyotome (Abb. 2.1). Das Sklerotom ist hierbei die Grundlage für die Bildung der Wirbel und Rippen, aus dem Dermomyotom entstehen die Haut und die Skelettmuskulatur (BRAND-SABERI und CHRIST 2000, AOYAMA und ASAMOTO 1988). Im Bereich des dorso-medialen Dermomyotoms kommt es zur Bildung des epaxialen Myotoms, aus welchem später die Rückenmuskulatur entsteht. Die Zellen des ventrolateralen Randes bilden das hypaxiale Myotom, einen Pool aus postmitotischen Muskelvorläuferzellen (HUANG und CHRIST 2000). Ein Teil dieser Muskelvorläuferzellen wird zur Rumpfmuskulatur, ein Teil delaminiert vom Rand und migriert in die Extremitätenknospen (Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1: Embryonaler Ursprung der Muskulatur.** Schematisierter Querschnitt, welcher die Skelettmuskulenterstehung aus den Somiten zeigt (modifiziert nach PERRY und RUDNICKI (2000)).

Während dieser Wanderung differenzieren sie zu Myoblasten. Durch Aktivierung des myogenen Programms kommt es zur Proliferation und somit zur Vergrößerung der Zellmasse



## 2. LITERATURÜBERSICHT

---

im Bereich der Muskelanlagen. Anschließend erfolgt die Differenzierung der Myoblasten in der Zielregion, welche nun zu mehrkernigen Muskelfasern fusionieren (BRAND-SABERI und CHRIST 1999, BIRCHMEIER und BROHMANN 2000, SCAAL et al. 1999).

Die embryonale Myogenese ist ein asynchroner Prozess, bei dem verschiedene Wellen der Zellrekrutierung durchlaufen werden. Ab Embryonaltag (E) 11 beginnt in der Maus die „primäre Myogenese“. Hierbei bildet ein Teil der embryonalen Myoblasten die sogenannten primären Muskelfasern im Bereich der späteren Muskelanlagen. Ab E14 erfolgt eine zweite Proliferationswelle, aus welcher ein Pool sekundärer Myoblasten hervorgeht. Diese bilden ab E16 nachweisbare sekundäre Muskelfasern (ONTELL und KOZEKA 1984, ROSS et al. 1987). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass sich primäre und sekundäre Muskelfasern in ihrer Genexpression und ihrem morphologischen Aufbau unterscheiden. So werden aus den primären Fasern später „langsame Muskelfasern“, während sich die sekundären Fasern zu „schnellen Muskelfasern“ spezialisieren (BUCKINGHAM et al. 2003). Ein letzter Anteil undifferenzierter Myoblasten bleibt bis zum Erwachsenenalter unter der Basallamina der Muskelfaser bestehen, die sogenannten Satellitenzellen (STOCKDALE 1997). Ihnen wird die Beteiligung an Muskelregenerationsprozessen nach Verletzungen der Muskulatur nachgesagt (DILWORTH und BLAIS 2011, SHADRACH und WAGERS 2011).

### 2.1.2 Regulation der Muskelentwicklung

Der Vorgang der Delamination und Migration der Muskelvorläuferzellen, sowie deren Proliferation und Differenzierung in den Extremitätenanlagen, ist von einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren abhängig. Beispiele hierfür sind Signalmoleküle, Adaptorproteine, aber auch Transkriptionsfaktoren. Zu Beginn spielen die Signalmoleküle Sonic hedgehog (Shh) (JOHNSON et al. 1994) und Wnt (zusammengesetzt aus Wg für wingless und dem Int-1 Gen) eine wichtige Rolle (MÜNSTERBERG et al. 1995). Shh wird von der Chorda dorsalis und dem ventralen Anteil des Neuralrohres gebildet (TEILLET et al. 1998). Es reguliert die Bildung des epaxialen Myotoms und induziert hier den frühen „Myogenic Regulatory Factor“ (MRF) Myf5 (BORYCKI et al. 1999). Alle MRFs gehören zur „basic helix-loop-helix“ (bHLH)-Familie der Transkriptionsfaktoren. Hierbei ist die Helix-Loop-Helix-Domäne für die Bindung an E-Proteine verantwortlich, während mit Hilfe der Basis-Domäne die DNA-Bindung erfolgt (LASSAR et al. 1991). Unterstützt wird die Bildung des Myotoms durch Wnt1, welches aus dem dorsalen Anteil des Neuralrohres stammt (STERN et al. 1995) und ebenfalls die Bildung von Myf5 induziert. Im Gegensatz dazu unterstützt Wnt7a (aus dem dorsalem Ektoderm), die Bildung des hypaxialen Myotoms, welches durch einen weiteren MRF, das MyoD charakterisiert ist (COSSU et al. 1996).

Bei der Delamination und Migration der Muskelvorläuferzellen aus dem hypaxialen Myotom in die Extremitätenknospen, sind der Transkriptionsfaktor *Pax3*, der Tyrosinkinase-rezeptor c-Met und der Transkriptionsfaktor *Lbx1* unentbehrlich. *Pax3* gehört zur Familie der Pax-Gene, welche durch eine Paired- und eine Homöodomäne gekennzeichnet sind. Es ist für die Iniziiierung und Aufrechterhaltung von *Myf5* und *MyoD* nötig (MAROTO et al. 1997). Bei einem Fehlen dieses Faktors, kommt es zu einer verringerten Vorläuferzellzahl im lateralen Dermomyotom und die Delamination unterbleibt (BIRCHMEIER und BROHMANN 2000). Dies hat eine massive Reduzierung der Muskulatur im Bereich der Gliedmaßen zur Folge (TAJBAKHS et al. 1997).

*C-Met* ist ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, welcher seine Antwort über das Adaptorprotein Gab1 vermittelt (SACHS et al. 2000). Aktiviert wird er durch den scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) (BIRCHMEIER und GHERARDI 1998). Dieses Trio sorgt für die korrekte Verteilung der Vorläuferzellen und beeinflusst ebenfalls deren Delamination (BLADT et al. 1995). Während des Delaminationsprozesses konnte die Expression von SF/HGF im umliegenden Mesenchym der Gliedmaßenanlagen nachgewiesen werden (YANG et al. 1996).

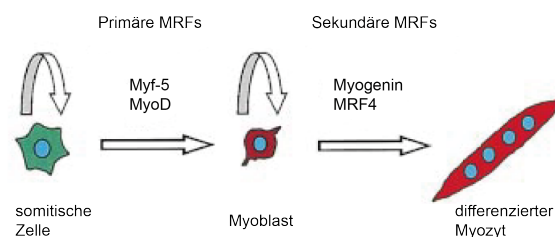
Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist das *Lbx1* (Ladybird Homeobox1). Dessen Vorkommen ist auf den migrierenden Vorläuferzellpool begrenzt (JAGLA et al. 1995). Wird *Lbx1* gezielt gehemmt, zeigt sich ein erstaunliches Bild: Muskelvorläuferzellen delaminieren und beginnen mit der Migration, schlagen aber keinen lateralen Weg in Richtung der Gliedmaßen ein, sondern wandern ventral und lassen sich später im Bereich der Diaphragmaanlage wiederfinden. Dies hat eine massive Muskelreduzierung sowohl im Bereich der Vorder- als auch der Hintergliedmaßen zur Folge (BROHMANN et al. 2000, SCHÄFER und BRAUN 1999).

Da nur ein kleiner Teil der Zellen in die Muskulanlagen migriert, sind Proliferationsprozesse nötig, um die endgültig benötigte Zellzahl zu erreichen. Hierbei wird erneut *Pax3* eine regulierende Funktion zugesprochen, da es in diesem Bereich nachgewiesen werden kann (AMTHOR et al. 1998). Eine weitere Rolle spielen Wachstumsfaktoren wie der „Fibroblast Growth Factor“ (FGF) (HANNON et al. 1996), das „Bone-Morphogenic-Protein 4“ (BMP-4) (AMTHOR et al. 1999) und der „Insulin-like Growth Factor-1“ (IGF-1) (BARTON-DAVIS et al. 1998). Diese mitogenen Effekte der Wachstumsfaktoren werden vor allem über den MAP (mitogen-activated protein)(Erk1/2)-Kinase-Weg vermittelt (HALEVY und CANTLEY 2004), welcher gleichzeitig die Differenzierung der Myoblasten verhindert (TORTORELLA et al. 2001). Interessanterweise spielt IGF-1 bei der späteren Zelldifferenzierung erneut eine Rolle. Hierbei wird der Effekt jedoch vermutlich über die Aktivierung der PI3-Kinase und der p38-MAP-Kinase vermittelt, was die unterschiedliche Funktion

## 2. LITERATURÜBERSICHT

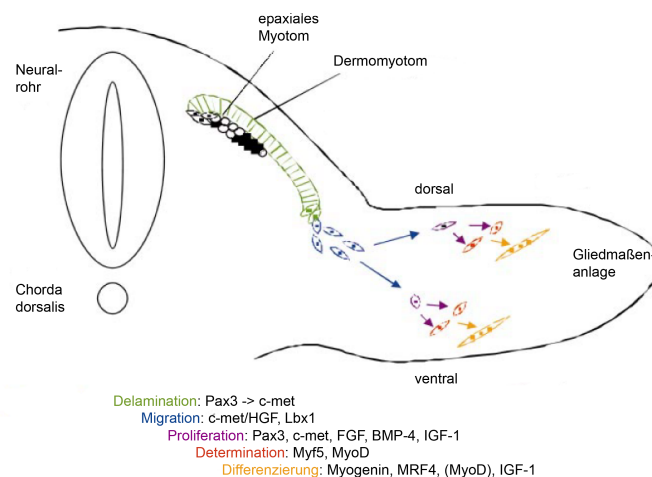
erklären würde (COOLICAN et al. 1997, SARKER und LEE 2004).

Parallel zur Migration beginnt die entgültige Determination der Vorläuferzellen durch die MRFs. Die Expression von *MyoD* und *Myf5* determiniert die somitische Vorläuferzelle zum Myoblasten (OTT et al. 1991, SASSOON 1993). Eine Co-Expression der Faktoren ist nötig, da Doppelknockout Mäuse keine Muskulatur aufweisen und kurz nach der Geburt sterben (RUDNICKI et al. 1993). Die anschließende Aktivierung der MRFs Myogenin und *MRF4* (BORYCKI et al. 1997) induziert die terminale Differenzierung, welche durch die Expression muskelspezifischer Proteine gekennzeichnet ist (DUPREZ 2002). Das Ergebnis sind mehrkernige Myotuben, welche sich aus den determinierten Myoblasten entwickelt haben (Abb. 2.2)(MOLKENTIN und OLSON 1996).



**Abbildung 2.2: Rolle der MRFs.** (SABOURIN und RUDNICKI 2000).

Eine Zusammenfassung der beteiligten Regulationsfaktoren an der Skelettmuskelentwicklung stellt die Abb. 2.3 dar.



**Abbildung 2.3: Zusammenfassung der Skelettmuskelentwicklung in der Gliedmaßenanlage.** Gezeigt sind die unterschiedlichen Stadien und die daran beteiligten Regulationsfaktoren (modifiziert nach BUCKINGHAM et al. (2003)).

Ein charakteristisches Protein für differenzierte Muskelzellen ist Aktin, welches sich zu Aktinfilamenten zusammenlagert. Ein zweites typisches Protein ist Myosin-II, welches aus zwei schweren (MHC) und vier leichten (MLC) Ketten besteht (ONTELL et al. 1993). Beide Proteine bilden einen funktionellen Aktin-Myosin-Komplex. Da dieser Komplex unverzichtbar für die Funktionalität von Muskelfasern ist, werden häufig Antikörper gegen Untereinheiten dieser Proteine als spezifische Muskelmarker verwendet. Ein Beispiel dafür ist MF20, welches an das sogenannte „light meromyosin“ (LMM) bindet und das C-terminale Ende einer schweren Kette darstellt (BADER et al. 1982).

Kommt es im Erwachsenenalter zu Muskelverletzungen und Regenerationsprozessen werden die Satellitenzellen aktiviert. Der vollständige Mechanismus ist bis heute nicht aufgeklärt, doch diese Zellen durchlaufen ein Proliferations- und Differenzierungsprogramm, welches in seiner Abfolge und Regulation der embryonalen Muskelentwicklung ähnelt (BUCKINGHAM et al. 2003).

## 2.2 Chemokine

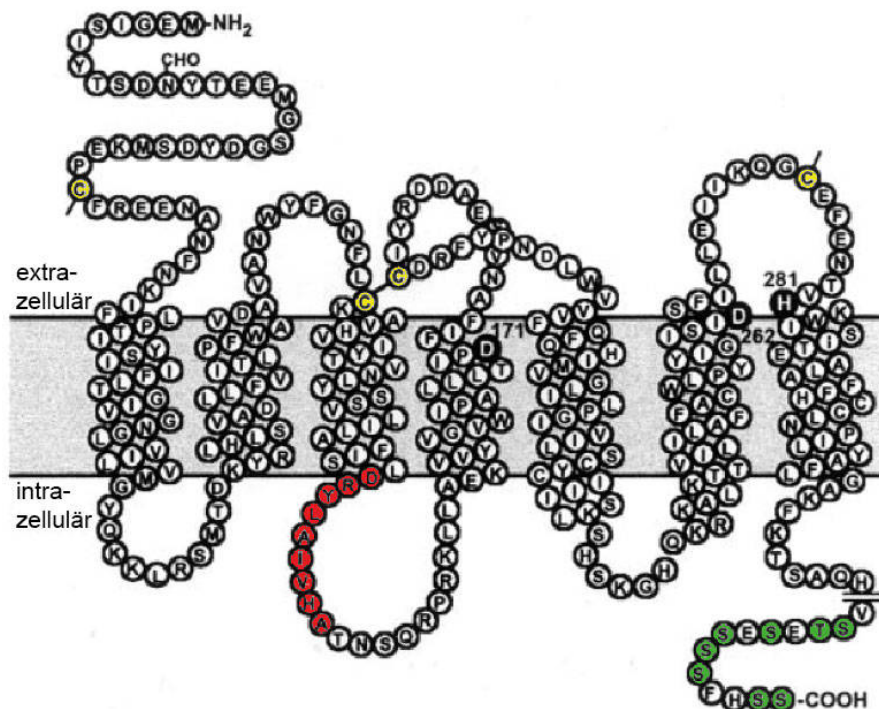
Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass weitere Stoffklassen an der Regulation der Muskelentwicklung und der Regeneration beteiligt sind, z.B. Chemokine. Diese basischen, chemotaktischen Proteine haben eine Größe von 8-14kDa. Hierbei leitet sich der Name von „*chemoattractant cytokines*“ ab, was ihre Zugehörigkeit zu den Zytokinen verdeutlicht (CARTIER et al. 2005). Die Entdeckung der Chemokine erfolgte auf Grund ihrer positiven Wirkung auf Leukozyten und deren Vorläuferzellen, welche mit Hilfe spezifischer Rezeptoren angelockt und aktiviert werden (BAGGIOLINI 1998). Mittlerweile ist ein breites Wirkungsspektrum bekannt: so spielen Chemokine eine Rolle bei der Zelladhäsion, Phagozytose, Zytokinsekretion, Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese und der viralen Pathogenese (STRIETER et al. 1995, MURPHY et al. 2000, BAJETTO et al. 2001, PEASE und MURPHY 1998). Bis heute sind mehr als 40 Chemokine beim Menschen und mehr als 30 bei der Maus identifiziert worden (ZLOTNIK und YOSHIE 2000). Die Einteilung erfolgt anhand der Anzahl und dem Abstand der konservierten Cysteinreste in der N-terminalen Region in vier Subfamilien. Die Klassen der CC- und CXC- Chemokine umfassen die bisher meisten Proteine. Bei den CC-Chemokinen sind beide Cysteine direkt benachbart. CXC-Chemokine weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine, CX3C-Chemokine drei beliebige Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen auf. Die vierte Gruppe der C-Chemokine besitzt lediglich einen N-terminalen Cysteinrest (Abb. 2.4)(MURPHY et al. 2000).

## 2. LITERATURÜBERSICHT

|              |                            |                |
|--------------|----------------------------|----------------|
| <b>CX3C:</b> | ...CXXXC.....C.....C.....  | <b>n=1</b>     |
| <b>CXC:</b>  | ...CX _ C.....C.....C..... | <b>n&gt;15</b> |
| <b>CC:</b>   | ...C _ _ .....C.....C..... | <b>n&gt;25</b> |
| <b>C:</b>    | .....C.....C.....          | <b>n=2</b>     |

**Abbildung 2.4: Klassifizierung der Chemokine.** Die Einteilung erfolgt anhand der konservierten Cysteinreste. n bezeichnet die bisher identifizierten Chemokine der jeweiligen Klasse (nach MURPHY et al. (2000)).

Chemokine vermitteln ihre spezifische Wirkung über 7-Transmembrandomänenrezeptoren, welche G-Protein-gekoppelt sind (GPCR's). Dabei kann in den meisten Fällen ein Chemokin an verschiedene Rezeptoren bzw. ein Rezeptor verschiedene Chemokine binden (ROLLINS 1997). Die GPCR's bestehen aus ca. 350 Aminosäuren, welche eine Polypeptidkette mit extra- und intrazellulären Anteilen bildet. Das N-terminale Ende ist relativ kurz, sauer und befindet sich extrazellulär. Es ist für die Bindung des Liganden verantwortlich und löst die Rezeptorantwort aus. Danach folgen sieben Transmembrandomänen, welche durch intra- und extrazelluläre „Loops“ miteinander verbunden sind.



**Abbildung 2.5: Aufbau eines GPCR.** Die Abbildung zeigt das N-terminale extrazelluläre Ende, die zwischen den Cysteinen ausgebildeten Disulfidbrücken (gelb), das „DRYLAIVHA“-Motiv (rot) und Serin und Threonin (grün) im C-terminalen Ende (modifiziert nach DECLERCQ (2001)).

Hierbei stabilisieren intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinaminosäuren die extrazellulären Schleifen. In der zweiten intrazellulären Schleife befindet sich das sogenannte „DRYLAIIVHA“-Sequenzmotiv, welches die Bindung an die G-Proteine vermittelt. Das intrazelluläre C-terminale Ende enthält zahlreich Serin und Threonin, welche nach der Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden (Abb. 2.5) (CARTIER et al. 2005).

### 2.2.1 Die Funktionen von CXCR4 und CXCR7

CXCR4 und CXCR7 sind Rezeptoren der CXC-Chemokinklasse. CXCR4 und der zugehörige Ligand SDF-1 $\alpha$  sind seit längerem ein gut untersuchtes System im Bereich der Chemokine. Mit der Entdeckung des CXCR7, welcher ebenfalls in der Lage ist, SDF-1 $\alpha$  zu binden (BALABANIAN et al. 2005) und ein ähnliches Expressionsmuster aufweist, rückte dieses Trio erneut in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen.

#### Der Chemokinrezeptor CXCR4

Das Chemokin SDF-1 $\alpha$  („Stromal cell-derived factor-1, auch CXCL 12) gehört zur Klasse der CXC-Chemokine und wurde ursprünglich auf Grund seiner chemotaktischen Wirkung auf B-Vorläuferzellen identifiziert (NAGASAWA et al. 1994). 1996 untersuchten BLEUL et al. (1996) und OBERLIN et al. (1996) bisher entdeckte Waisenrezeptoren, und konnten den bis dahin als LESTR/Fusin bezeichneten CXCR4 als funktionellen Rezeptor für SDF-1 $\alpha$  identifizieren. Dieser war bereits als funktioneller Co-Rezeptor bei der HIV-Infektion beschrieben worden (FENG et al. 1996). Nach der Zuordnung zu den Chemokinrezeptoren wurde die Lokalisation des neuen Rezeptors charakterisiert. CXCR4 wird während der Organentwicklung in der Embryogenese (E7,5, E11,5, E15,5 und E17,5) und in vielen adulten Organen wie Gehirn, Lunge, Herz, Milz, Leber, Nieren und anderen exprimiert (NAGASAWA et al. 1996, FEDERSPIEL et al. 1993). Aufschluss über die Funktion geben CXCR4-defiziente Mäuse. Diese Tiere zeigen eine hohe Anzahl unterschiedlichster Defekte und versterben bereits kurz vor der Geburt in utero. Hierbei lassen sich neben Herzfehlbildungen, eine gestörte Blutbildung im Knochenmark, eine verringerte Gefäßbildung im Magen-Darm-Trakt und eine verminderte B-Lymphozytenbildung nachweisen. Desweiteren zeigen CXCR4 Knock-out Tiere eine gestörte Morphogenese des Hippocampus und der Großhirnrinde und eine unvollständige Wanderung der Körnerzellen, welche zu einer Entwicklungsbeeinträchtigung des Kleinhirns führt (TACHIBANA et al. 1998, MA et al. 1998, ZOU et al. 1998). Gleichzeitig konnten in den betroffenen Tieren auch Defekte im peripheren Nervensystem festgestellt werden. Pränatale Tiere zeigten gegenüber den Wildtypen deutlich reduzierte Zahlen an  $\alpha$ -Moto- und Spinalganglienneuronen. Hierbei ist der Verlust der Motoneurone nur eine indirekte, die reduzierte Anzahl der DRG-Neurone

## 2. LITERATURÜBERSICHT

---

jedoch eine primäre Folge der CXCR4-Inaktivierung (ÖDEMIS et al. 2005).

Zusätzlich konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass auch myogene Vorläuferzellen den CXC-Rezeptor 4 exprimieren und zusätzlich SDF-1 $\alpha$  im umliegenden Gewebe darstellbar ist (ÖDEMIS et al. 2005). Dies ließ ebenfalls auf eine Beteiligung dieses Duos im Bereich der Myogenese schließen. So konnten YUSUF et al. (2005) eine durch SDF-1 $\alpha$  induzierte Migration von Muskelvorläuferzellen in Hühnerembryonen belegen. In CXCR4(-/-) Tieren ist zwischen E10 und E11 die Anzahl der migrierenden myogenen Vorläuferzellen erheblich reduziert und somit die Besiedlung der Extremitätenknospen vermindert. Dieser Effekt kann in den folgenden Entwicklungstagen ausgeglichen werden. Ab E16 treten jedoch erneute Defekte auf. Im Vergleich zum Wildtyp sind diese durch eine massiv reduzierte Muskelmasse, sowie das Fehlen einzelner Muskeln charakterisiert, was sich durch eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors Myogenin zeigt (VASYUTINA et al. 2005, ÖDEMIS et al. 2005). ÖDEMIS et al. (2007) konnten einen Teil der Funktionsweise des CXCR4 in der Myogenese aufklären. So stellte sich heraus, dass SDF-1 $\alpha$  konzentrationsabhängig einen positiven Effekt auf die Proliferation und die Migration von C2C12-Zellen (siehe 2.4) hat, deren Differenzierung jedoch inhibiert. Desweiteren konnten die dazugehörigen Signalwege, die spezifische Aktivierung von Erk und PKC $\zeta$  gezeigt werden.

### Der Chemokinrezeptor CXCR7

CXCR7 wurde, aus historischer Sicht, bereits vor über 20 Jahren das erste Mal aus der Schilddrüse des Hundes kloniert und bekam den Namen Receptor Dog cDNA 1 (RDC1). In den 90er Jahren wurde versucht, den entsprechenden Liganden zu finden. Doch als sich Vertreter wie Bradykinin, Parathyroid-Hormon, Calcitonin, Thrombin, Vasopressin und andere als falsch herausstellten, blieb der Begriff „orphan-receptor“ bestehen (LAW und ROSENZWEIG 1994). Als BALABANIAN et al. (2005) und BURNS et al. (2006) zeigen konnten, dass SDF-1 $\alpha$  und I-TAC (interferon-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant) wirksame Liganden sind, war eine entgültige Zuordnung des Rezeptors möglich. Somit wurde RDC1 offiziell „deorphanized“ und als siebter Rezeptor der CXC-Chemokinfamilie als CXCR7 bezeichnet. Die Lokalisation des CXCR7 ist ebenso vielfältig, wie die des CXCR4. So konnte der Rezeptor in verschiedenen Geweben des Körpers nachgewiesen werden. Zunächst untersuchte man die verschiedenen Zellen des hämatopoetischen Systems und stellte die Expression auf Neutrophilen, Monozyten und B-Zellen fest (BALABANIAN et al. 2005, INFANTINO et al. 2006). Aber auch in neuronalem Gewebe, besonders im Gehirn, ist CXCR7 embryonal und postnatal im Bereich des Cortex, der Blutgefäße, den Ventrikelwänden, aber auch in den ventrolateralen hypothalamischen Kernen, dem

medialen Thalamus oder dem Stammhirn zu finden. Hierbei stellten sich bisher Astrozyten, Schwannzellen, Pyramiden- und Körnerzellen als CXCR7-positive Vertreter heraus (SCHÖNEMEIER et al. 2008, ÖDEMIS et al. 2010). Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Tumorzelllinien konnte ebenfalls CXCR7 nachgewiesen werden. So zeigten HeLa Cervikalkarzinom-, T98G Glioma- aber auch LWCaP Prostatakrebszelllinien besonders hohe Expressionslevel. Funktionell konnte man eine Förderung des Tumorwachstums und ein besseres Überleben, sowie eine gesteigerte Metastasierungsrate im Zusammenhang mit CXCR7 feststellen (GRYMULA et al. 2010). Diese *in vitro* Erkenntnisse konnten *in vivo* bestätigt werden. So wurde CXCR7 ebenfalls in Biopaten von Colon-, Lungen-, Brust- und Prostatakrebspatienten nachgewiesen (MIAO et al. 2007, WANG et al. 2008). Weitere Erkenntnisse konnten mit Hilfe von CXCR7 Knock-out Tieren gewonnen werden. Hier wurde beobachtet das diese Tiere zwar lebendig geboren wurden, jedoch binnen wenigen Tagen postnatal an Herzdefekten verstarben. Es zeigten sich Defekte an den Herzklappen, aber auch fibrotische Myokarddefekte (SIERRO et al. 2007, GERRITS et al. 2008). Genauere Untersuchungen an der Skelettmuskulatur fehlen jedoch. Die Existenz des CXCR7 in C2C12-Zellen konnte nachgewiesen werden (MELCHIONNA et al. 2010), doch ob und wie dieser, im Vergleich zum CXCR4, *in vivo* in die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Muskulatur involviert ist, ist bisher unklar.

CXCR7 hat unterschiedliche Funktionen. So kann CXCR7 ein signalvermittelnder Rezeptor sein. In Astrozyten und Schwannzellen blieb die Signalaktivierung von Erk und Akt durch SDF-1 $\alpha$  auch bestehen, als der CXCR4 ausgeknockt wurde (ÖDEMIS et al. 2010). In Oligodentroyten konnte die Reifung und Myelinbildung in Abhängigkeit von der Erk-Aktivierung durch CXCR7 gezeigt werden (GÖTTLE et al. 2010). Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung von  $\beta$ -Arrestin in Gefäßmuskelzellen durch CXCR7 und die daraus resultierende Migration (RAJAGOPAL et al. 2010). Im Gegensatz dazu sind jedoch auch signalunabhängige Funktionen bekannt. So konnte SIERRO et al. (2007) mit Hilfe einer FRET-Analyse zeigen, dass CXCR4 und CXCR7 funktionelle Heterodimere in HEK 293-Zellen bilden. Dadurch wurde der Calciumeinstrom erhöht und die Chemokinantwort moduliert. Desweiteren ist eine umgebungsmodulierende Funktion bekannt, bei welcher der CXCR7 als „scavenger“-Rezeptor wirkt. Hierbei wird durch die Bindung des SDF-1 $\alpha$  und die Internalisierung des Rezeptors ein Gradient erzeugt, welcher für die gerichtete Zellmigration notwendig ist (NAUMANN et al. 2010, BOLDAJIPOUR et al. 2008).

### 2.2.2 Chemokine bei der Muskelregeneration

Die Muskelregeneration ist ein Vorgang an dem intrinsische und extrinsische Faktoren beteiligt sind. Hierzu gehört besonders die Aktivierung von Satellitenzellen und deren Mi-



## 2. LITERATURÜBERSICHT

---

gration in die geschädigten Gebiete, sowie der Proliferation und Differenzierung zu funktionellen Muskelfasern (CHAZAUD et al. 2003). Zusätzlich sind in degenerativen und regenerativen Gebieten immer Zellen des Immunsystems anzutreffen. Zum Einen übernehmen sie ihre inflammatorischen Aufgaben, zum Anderen wurde eine umgebungsmodulierende Funktion nachgewiesen. So spielen, wie in der embryonalen Myogenese, z.B. IGF I und II, HGF und TGF (transformierender Wachstumsfaktor) eine Rolle bei der Migration und Proliferation (HAWKE und GARRY 2001), während IL-10 (Interleukin-10) eine Schlüsselrolle bei der Faserfusion einnimmt (STRLE et al. 2007). Mittlerweile konnte auch die Beteiligung von Chemokinen an der Muskelregeneration nachgewiesen werden. So konnten YAHIAOUI et al. (2008) zeigen, dass MCP-1 und MIP-1 (Chemokine der CC-Familie) die Proliferation von Muskelvorläuferzellen fördern. Auch aus der CXC-Familie sind Chemokine involviert. ZHANG et al. (2009) erbrachten den Nachweis, dass regenerierende Muskelfasern eine erhöhte Expression des CXCR6 aufweisen. Knock-out Tiere von CXCL16 (dem Ligand des CXCR6) zeigten einerseits verminderte Zellproliferation und Differenzierung, andererseits eine veränderte Zusammensetzung der inflammatorischen Zellen und einem daraus resultierenden verändertem Milieu an extrinsischen Faktoren. Hieraus lässt sich erkennen, dass der Prozess der Muskelregeneration sehr vom Zusammenspiel gewebeeigener und exogener Faktoren abhängig ist (BISCHOFF 1990).

Ebenso ist der CXCR4 an der Muskelregeneration beteiligt. Erste Hinweise gaben *in vitro* Versuche, welche die chemotaktische Antwort von CXCR4+ C2C12-Zellen auf SDF-1 $\alpha$  zeigten. GRIFFIN et al. (2010) bewiesen, dass CXCR4 vermehrt in myogenen Zellen, drei Tagen nach einer gesetzten Verletzungen exprimiert wird. Auch die Konzentration von SDF-1 $\alpha$  war in Muskelhomogenat signifikant erhöht. Funktionell zeigte sich eine verminderte Zellfusionsrate, wenn CXCR4 mit dem pharmakologischen Blocker AMD3100 inhibiert wurde. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass aus dem Knochenmark gewonnene Vorläuferzellen (SP-Zellen) myogene Marker exprimieren und in der Lage sind einen zusätzlichen Zellpool für die Regeneration der Muskulatur zu bilden (GUSSONI et al. 1999, CORTI et al. 2002). PEREZ et al. (2009) konnten zeigen, dass diese SP-Zellen CXCR4+ sind, und der Chemokinrezeptor für die Wanderung der Zellen aus den Blutgefäßen in die geschädigte Muskulatur verantwortlich ist. Der CXCR7 wird in adulten primären Mäusemuskelzellen exprimiert (GRIFFIN et al. 2010). Seine Funktion bei der Muskelregeneration ist jedoch bis heute ungeklärt. Dieser Komplex der Chemokine bedarf weiterer Aufklärung, wofür sich die mdx-Maus als Modell der Duchennenschen Muskelerkrankung mit Phasen der Muskelregeneration besonders eignet und weitere Hinweise zu *in vivo* - Verhältnissen liefern kann. Diese sollen später neue Therapieansätze für die Behandlung von Muskeldystrophien bilden.

### 2.3 Duchenne´sche Muskelerkrankung

Eine der häufigsten muskulären Erbkrankheiten im Kindesalter ist die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (Duchenne´sche Muskelerkrankung, DMD), welche bereits im 20. Jahrhundert beschrieben wurde (MOSER 1984). Die Ursache der DMD liegt in einer Mutation des Dystrophingens, welches X-chromosomal (Genlocus: Xp21) vererbt wird und zum Fehlen des Proteins führt (HOFFMAN et al. 1987, RAY et al. 1985). Dystrophin ist ein Teil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, welcher für die Verknüpfung des Sarkomlemms und der extrazellulären Matrix mit dem Aktin-Zytoskelett der Muskelzelle verantwortlich ist. Es ist damit ein essentieller Bestandteil einer funktionsfähigen Muskelfaser (MATSUMURA et al. 1993). Der Mangel führt unter anderem durch einen mechanischen Verschleiß der unzureichend verankerten Muskelfaserbestandteile zu lokal begrenzten nekrotischen Veränderungen und der Hypertrophie von Muskelfasern. Zusätzlich lassen sich vermehrt Makrophagen und CD4+ Lymphozyten in unmittelbarer Umgebung detektieren. In Biopsaten Betroffener lassen sich jedoch ebenso unreife Muskelfasern mit zentral gelegenen Kernen feststellen, welche auf Muskelregenerationsprozesse hinweisen. Somit kommt es in der frühen Erkrankungsphase zu einer Balance zwischen degenerativen und regenerativen Prozessen (PASTORET und SEBILLE 1995). Im weiteren Verlauf der Erkrankung erschöpfen sich die regenerativen Möglichkeiten und es kommt zum Ersatz der Muskelfasern durch Binde- und Fettgewebe (DECONINCK und DAN 2007). Hieraus resultieren dann die typischen Symptome wie die Gehunfähigkeit und die spätere progrediente Ventilationsstörung. Die Förderung der regenerativen Prozesse ist bis heute einer der Haupttherapieansätze, welcher detaillierte Kenntnisse der Muskelregeneration voraussetzt.

#### 2.3.1 Ein Tiermodell: Die mdx-Maus

Ein etabliertes Tiermodell der DMD ist die *muscular dystrophy x* (kurz: mdx) Maus. Sie trägt eine Mutation im Maus-Homolog des humanen Dystrophin-Genes (X-Chromosomen lokalisiert) und wurde 1984 als Spontanmutation in einem C57BL/10ScSN Stamm entdeckt (BULFIELD et al. 1984). Erste Dystrophiesymptome treten bereits ab der dritten Lebenswoche auf. Hierbei zeigen sich histopathologisch an der Skelettmuskulatur Nekrosen, entzündliche Infiltrationen und Fibrosierungen. Dies äußert sich funktionell in einer verringerten Muskelspannung und einer verlängerten Relaxationszeit (DANGAIN und VRBOVA 1984). Die Pathologie nimmt im Verlauf des ersten halben Lebensjahres wieder ab und bleibt dann auf einem vergleichsweise mildem Niveau bestehen (MUNTONI et al. 1993). Dies zeigt sich in histopathologischen De- und Regenerationsbereichen mit einer lokalen Immunzellinfiltration ohne klinische Symptomatik (CARNWATH und SHOTTON

1987). Damit zeigt die mdx-Maus im Gegensatz zur DMD trotz identischer Ätiologie einen milderen Phänotyp (TORRES und DUCHEN 1987). Die genauen Gründe für die unterschiedlichen Ausprägungen von Muskeldystrophien in verschiedenen Spezies sind noch nicht geklärt.

### 2.4 C2C12-Zellen

Da Untersuchungen *in vivo* häufig schwierig sind, werden für die Gewinnung erster Erkenntnisse *in vitro* - Modelle eingesetzt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden sogenannte C2C12-Zellen verwendet. Diese Zelllinie stellt ein etabliertes Zellmodellsystem zur Untersuchung der Myogenese dar. Ihren Ursprung hat sie in einem von YAFFE und SAXEL (1977) durchgeführten Experiment. Hierfür wurden C3H-Mäusen Verletzungen im Bereich der Oberschenkel zugefügt und 70 h später eine erhöhte Ausbeute an mononukleären myogenen Zellen gewonnen, welche embryonalen Myoblasten ähnelten. Sie zeigten nach drei bis vier Tagen erste Zellfusionen und multinukleäre Fasern *in vitro* (Abb. 2.6) und wurden als C2-Zelllinie bezeichnet (YAFFE und SAXEL 1977).



**Abbildung 2.6: Kultivierte mehrkernige Muskelfasern.** Künstlich induzierte Differenzierung von C2-Zellen (YAFFE und SAXEL 1977).

In den 80er Jahren wurde die C2-Zelllinie im Labor von Helen Blau, Stanford University subkloniert, woraus die C2C12-Zellen entstanden (BLAU et al. 1983). Dieses *in-vitro*-System hat den Vorteil, dass die Zellen schnell und einfach verfügbar sind und, im Vergleich zu primären Myoblasten, die Untersuchung der Myogenese auf molekularer Ebene ohne den Einfluss kontaminierender Fibroblasten ermöglichen.

Unter serumhaltigen Kulturbedingungen (10% Serum im Medium) proliferieren C2C12-Zellen und weisen die Morphologie von undifferenzierten myogenen Vorläuferzellen auf. Wird der Serumanteil auf 1-2% begrenzt, beginnen diese sich zu Myotuben zu differenzieren und verschmelzen letztendlich zu funktionellen Muskelfasern (ANDRÉS und WALSH 1996, BENNETT und TONKS 1997).

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Tiere

### C57BL/6-Mäuse

C57BL/6-Mäuse (kurz: B6) gehören zu einem Inzuchtstamm, welcher 1921 von C.C. Little gezüchtet wurde. Bis heute zählt er zu den am häufigsten in der Wissenschaft verwendeten Inzuchtstämmen. Die hier genutzten Tiere der unterschiedlichen Altersklassen 18. Embryonaltag (E18, vier Tiere), 3. postnataler Tag (P3, drei Tiere), 16. postnataler Tag (P16, vier Tiere) und Adult (A, drei Tiere) stammen aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum (MEZ) der Medizinischen Fakultät Leipzig bzw. aus dem Forschungslabor der Fakultät für Kardiologie des Herzzentrums Leipzig, PD Dr. rer. nat. habil. Adams.

### mdx-Mäuse

Mdx-Mäuse gehören einem Inzuchtstamm an, welcher als Modell für die Duchenne'sche Muskelerkrankung steht. Die hier untersuchten Tiere waren 6 Monate alt (Adult) und stammten aus dem Forschungslabor der Fakultät für Kardiologie des Herzzentrums Leipzig, PD Dr. rer. nat. habil. Adams. Da die Tiere für unterschiedliche Fragestellungen genutzt wurden, erhielt die Arbeitsgruppe Prof. Engele den Musculus quadriceps femoris (3x) für anstehende Untersuchungen.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Chemikalien

|                                           |                                   |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|
| 2-Merkaptoethanol, $\geq 98\%$            | Sigma-Aldrich, Seelze             |
| 3,3',5-Trijod-L-Thyronin                  | Sigma-Aldrich, Seelze             |
| 5-Sulfosalicylsäure Dihydrat, $\geq 99\%$ | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Albumin bovine Fraction V, pH 7.0         | Serva-Electrophoresis, Heidelberg |
| Albumin Standard                          | Thermo Scientific, Ulm            |
| Ammoniumpersulfat $\geq 98\%$             | Sigma-Aldrich, Seelze             |
| Aqua B. Braun, steril und pyrogenfrei     | B. Braun, Melsungen               |
| BCA Protein Assay (Reagent A+B)           | Thermo Scientific, Ulm            |
| Bromphenolblau Na-Salz                    | Carl Roth, Karlsruhe              |
| D(+)-Saccharose, $\geq 99,7\%$ , pulv.    | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Dako Glycergel Mounting Medium            | Dako North America                |
| ECL Western Blot Detection Reagents       | GE Healthcare, München            |
| Essigsäure, 99-100%, glacial              | J. T. Baker, Griesheim            |
| Ethidiumbromidlösung 1 %, 10 mg/ml        | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Formaldehyd-Lösung, 4 % gepuffert, 10l    | Otto Fischar, Saarbrücken         |
| Glycerin 85%                              | Merck, Darmstadt                  |
| Glycin, Pufferan® $\geq 99\%$ , p.a.      | Carl Roth, Karlsruhe              |
| IGEPAL® CA-630 = NP-40                    | Sigma-Aldrich, Seelze             |
| Insulin (bovin), $\geq 25$ USP units/mg   | Sigma-Aldrich, Seelze             |

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

|                                              |                                    |
|----------------------------------------------|------------------------------------|
| Kaisers Glyceringelatine                     | Merck, Darmstadt                   |
| Methanol                                     | J. T. Baker, Griesheim             |
| Natriumazid reinst                           | Merck, Darmstadt                   |
| Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$ , p.a.         | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat         | Merck, Darmstadt                   |
| Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat             | J. T. Baker, Griesheim             |
| peqGold Universal-Agarose                    | PEQLAB, Erlangen                   |
| Phire Animal Tissue Direct PCR Kit           | Finnzymes, Schwerte                |
| Ponceau S                                    | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Progesteron, $\geq 99\%$                     | Sigma-Aldrich, Seelze              |
| Putrescin                                    | Sigma-Aldrich, Seelze              |
| Rotiphorese® Gel 40 (29:1)                   | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Salzsäure 25%, Rotipuran® $\geq 25\%$ , p.a. | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Saponin                                      | Sigma-Aldrich, Seelze              |
| SDS / Natriumlaurylsulfat                    | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Sodiumorthovanadat, $\geq 90\%$ (Titration)  | Sigma-Aldrich, Seelze              |
| Sudan Schwarz                                | Dr. Hollborn & Söhne GmbH, Leipzig |
| TEMED, 99%, p.a.                             | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Tissue Tek                                   | Sakura, Staufen                    |
| Titriplex® III (EDTA)                        | Merck, Darmstadt                   |
| Trichloressigsäure zur Analyse               | Merck, Darmstadt                   |
| TRIS, Pufferan® $\geq 99,9\%$ Ultra Qualität | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Triton X 100, reinst                         | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Tween®20, Ph.Eur.                            | Carl Roth, Karlsruhe               |

#### 3.2.2 Verbrauchsmaterialien

|                                                                      |                                       |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| CryoPure 1,2ml Kryoröhre, grün                                       | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF, 18x24                               | Fuji Film Europe GmbH, Düsseldorf     |
| Gel Blotting Paper, 580x580mm                                        | Whatman, Dassel                       |
| Menzel-Gläser, Deckglas Ø15 mm                                       | Menzel GmbH, Braunschweig             |
| Menzel-Gläser, Deckglas 24 mm × 60 mm                                | Menzel GmbH, Braunschweig             |
| Menzel-Gläser, geschnitten, Mattrand                                 | Menzel GmbH, Braunschweig             |
| Pap Pen                                                              | Science services, München             |
| Pipettenspitzen blau, 1000µl                                         | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Pipettenspitzen farblos, 10µl                                        | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Pipettenspitzen gelb, 200µl                                          | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Reagiergefäß 1,5ml, farblos                                          | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Reaktionsgefäß 0,6ml, glatt                                          | Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf |
| Schraubröhre 15 ml, 120 x 17 mm, Spitzboden                          | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Schraubröhre 50 ml, 114 x 28 mm, Spitzboden                          | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Transfermembran Protran® BA 85                                       | Whatman, Dassel                       |
| Zellkulturplatte 12 well (3.596 cm <sup>2</sup> Wachstumsoberfläche) | TPP, Trasadingen                      |

Zellkulturschale Ø10 cm (9,2 cm<sup>2</sup> Wachstums-  
tums-oberfläche)

TPP, Trasadingen

### 3.2.3 Medien/Medienzusätze/Transfektion

AMD 3100  
CCX 771  
DMEM 4,5g/L Glucose mit L-Glutamin  
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥99.9%  
Fötale Kälberserum (FCS)  
Gentamicin (10mg/ml)  
Ham's F12 Medium mit L-Glutamin  
SDF-1 α  
siPORT<sup>TM</sup> Amine Transfektionsreagenz  
siRNA Rn\_CXCR4\_6  
siRNA Mm\_CXCR7\_3  
Transferrin  
Trypsin, 0,5% (10x) mit 4Na-EDTA  
Ziegen Serum

Sigma-Aldrich, Seelze  
ChemoCentryx, Mountain View  
Lonza, Verviers  
Sigma-Aldrich, Seelze  
GIBCO®Invitrogen, Darmstadt  
GIBCO®Invitrogen, Darmstadt  
Lonza, Verviers  
Upstate biotechnology, Charlottesville  
Ambion, Darmstadt  
Qiagen GmbH, Hilden  
Qiagen GmbH, Hilden  
GIBCO®Invitrogen, Darmstadt  
GIBCO®Invitrogen, Darmstadt  
GIBCO®Invitrogen, Darmstadt

### 3.2.4 Geräte

Biofuge fresco  
Blot-Einheit: Power Pac 200 + Trans Blot  
Semi Dry Transfer Cell  
Brutschrank, steril, Typ BB 6220 CU  
Entwicklergerät, Typ 9462/106  
FACS Calibur Flow Cytometer  
Feinwaage (max. 210g)  
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan 2  
Kryostat, CM 3050 S  
Kühlschrank +4°C, Labex  
LSM 510/Axiovert 100  
Lichtmikroskop, Axiovert 25  
Magnetrührer RTC basic  
Megafuge 1.0 R  
Mikrowelle 8020  
Pipettboy acu  
Pipetten 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl  
Präzisionswaage (max. 1200g)  
Schüttler (IKA-VIBRAX-VXR)  
SpectraMax Plus384  
Sterilwerkbank, Typ KS 15/12  
Thermomixer compact

Heraeus, Hanau  
Bio-Rad, München  
  
Heraeus, Hanau  
Agfa Gevaert N.V., Mortsel  
Becton Dickinson, Heidelberg  
Omnilab, Bremen  
Zeiss, Göttingen  
Leica, Wetzlar  
Philipp Kirsch GmbH, Offenburg  
Zeiss, Jena  
Carl Zeiss, Jena  
Janke&Kunkel, Staufen  
Heraeus, Hanau  
Privileg  
Integra Biosciences, Fernwald  
Gilson, Middleton, USA  
  
Kern&Sohn, Balingen-Frommern  
Janke&Kunkel, Staufen  
Molecular Devices, Ismaning  
Heraeus, Hanau  
Eppendorf, Hamburg

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

Tiefkühlschrank -30°C, Liebherr comfort  
Ultraschallgerät Sonoplus  
Vakuumabsauger, Vacusafe  
Vortexer, Vortex-Genie 2  
Wasserbad  
Western Blot Kammer System

Liebherr, Bulle/Schweiz  
Bandelin Electronic, Berlin  
Integra Biosciences, Fernwald  
Scientific Industries, NY, USA  
GFL, Burgwedel  
Bio-Rad, München

#### 3.2.5 PCR/Sonstiges

Bench Top Ladder DNA  
BioTaq PCR Kit  
PageRuler™ Plus Prestained Protein  
Ladder  
PCR-Primer  
Peroxidase Substrate Kit AEC  
Phire Animal Tissue Direct PCR Kit  
Vectostain Elite ABC-Kit

Promega GmbH, Mannheim  
BioLine GmbH, Luckenwalde  
Fermentas, Leon-Rot  
  
Thermo Scientific, Ulm  
Vector Laboratories, Burlingame  
Thermo Scientific, Ulm  
Vector Laboratories, Burlingame

#### 3.2.6 Antikörper

##### Primärantikörper

CXCR4 antibody, monoklonal, Anti-Rat,  
WB: 1:1000, FACS: 1:400  
CXCR4, polyklonal, Anti-Rabbit, WB:  
1:1000, IHC/FACS: 1:400  
CXCR7/GPR159 (c-term), polyklonal,  
Anti-Rabbit, WB: 1:1000, IHC: 1:400  
11G8, monoklonal, Anti-Mouse, FACS:  
1:400  
Fibronectin, Anti-Mouse, IHC: 1:400  
GAPDH, monoklonal, Anti-Mouse, WB:  
1:6000  
Laminin, Anti-Rat, IHC: 1:400  
MF20, monoklonal, Anti-Mouse, WB:  
1:3000, IHC/FACS: 1:2000  
Myogenin, monoklonal, Anti-Mouse, WB:  
1:1000  
p44/42 MAPK (Erk1/2), monoklonal,  
Anti-Rabbit, WB: 1:1000  
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), mono-  
klonal, Anti-Rabbit, WB: 1:2000  
Phospho-PKCzeta/lambda, polyklonal,  
Anti-Rabbit, WB: 1:1000

Abcam, Cambridge  
  
Abcam, Cambridge  
  
Acris, Herford  
  
ChemoCentryx, Mountain View  
  
Sigma-Aldrich, Seelze  
Fitzgerald Industries International,  
Concord, USA  
Sigma-Aldrich, Seelze  
DSHB, Iowa  
  
Santa Cruz, Heidelberg  
  
Cell Signaling, Danvers  
  
Cell Signaling, Danvers  
  
Cell Signaling, Danvers

|                                                        |                         |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|
| Phospho-PKC (pan), monoklonal, Anti-Rabbit, WB: 1:1000 | Cell Signaling, Danvers |
| SDF-1 $\alpha$ , Anti-Rabbit, IHC: 1:1000              | PeproTech, Hamburg      |

#### Sekundärantikörper (peroxidasekonjugiert)

|                                    |                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| Donkey-Anti-Mouse IgG, WB: 1:3000  | Jackson Immunoresearch, Baltimore |
| Donkey-Anti-Rabbit IgG, WB: 1:3000 | Jackson Immunoresearch, Baltimore |
| Goat-Anti-Rat IgG, WB: 1:3000      | Santa Cruz, Heidelberg            |

#### Sekundärantikörper (biotinyliert)

|                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Horse-Anti-Mouse IgG, IHC: 1:400 | Vector Laboratories, Burlingame |
|----------------------------------|---------------------------------|

#### Sekundärantikörper (Fluoreszenz)

|                                                                                          |                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Goat-Anti-Mouse IgG, Cyanin2-konjugiert, IHC: 1:400                                      | Jackson Immunoresearch, Baltimore |
| Goat-Anti-Mouse IgG, F(ab') <sub>2</sub> Fragment, Phycoerythrin-konjugiert, FACS: 1:400 | Jackson Immunoresearch, Baltimore |
| Goat-Anti-Mouse IgG, FITC-konjugiert, FACS: 1:400                                        | Jackson Immunoresearch, Baltimore |
| Goat-Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert, IHC/FACS: 1:400                        | Invitrogen, Darmstadt             |
| Goat-Anti-Rabbit IgG, Cyanin3-konjugiert, IHC: 1:400                                     | Jackson Immunoresearch, Baltimore |
| Goat-Anti-Rat IgG, Alexa Fluor 488-konjugiert                                            | Invitrogen, Darmstadt             |

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 C2C12-Zellen - Aufbewahrung und Kultivierung

C2C12 Zellen sind eine murine Myoblastenzelllinie. Diese wurde 1977 von Yaffe und Saxel durch fortlaufende Passagierung von dystrophischen Muskelzellen aus dem Oberschenkel der Maus erzeugt (YAFFE und SAXEL 1977). Sie besitzen unter geeigneten Kultivierungsbedingungen die Fähigkeit zur Differenzierung. Der hier verwendete Pool tiefgefrorener C2C12 Zellen stammt aus dem Max-Bürger-Zentrum, Leipzig, AG Prof. Dr. Engeland. Sie waren in CryoPure Gefäßen tiefgefroren und lagerten bis zu ihrer Verwendung in einem Flüssigstickstofftank. Zur Kultivierung wurden die Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut und einmal mit Proliferationsmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10 % fötales Kälberserum (FCS) + Gentamicin (5 µg/ml) gewaschen. Anschließend wurden sie bei 1400 rpm (Megafuge), 4 min abzentrifugiert, in 10 ml des Proliferationsmediums resuspendiert und auf einer Ø10 cm Zellkulturschale ausgesät. Die Kultivierung



### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Bei einer Dichte von 80 % wurde die Zelllinie passagiert. Dazu erfolgte nach Abnahme des Proliferationsmediums ein einmaliges Waschen mit 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, diese Reaktion nach 3 min mit Proliferationsmedium gestoppt und die Zellsuspension bei 1400 rpm, 4 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Zellpellet in frischem Proliferationsmedium resuspendiert und somit weiter kultiviert werden.

|                      |                                    |            |
|----------------------|------------------------------------|------------|
| <b>PBS 10 mM:</b>    | Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat | 386,4 mg/l |
| (pH=7,5)             | Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat   | 1,02 g/l   |
|                      | Natriumchlorid                     | 8,8 g/l    |
| <b>Trypsin/EDTA:</b> | Trypsin/EDTA (0,5%)                | 0,2 ml     |
|                      | PBS                                | 9,8 ml     |

Zum Einfrieren wurde das Zellpellet in 800 µl Proliferationsmedium (+ 100 µl DMSO + 100 µl FCS) resuspendiert, in CryoPure Gefäßen langsam auf -80°C abgekühlt und in Flüssigstickstoff tiefgefroren.

#### 3.3.2 Differenzierung und Versuchsanordnung

C2C12-Zellen besitzen die Eigenschaft, sich unter Reduktion des Serums im Medium zu differenzieren. Um diesen Effekt zu erzielen, wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 70-80% in Proliferationsmedium gehalten. Anschließend erfolgte ein Wechsel auf Differenzierungsmedium, in welchem die Zellen bis zu 96 h weiter kultiviert wurden. Bereits ab dem zweiten Tag konnte im Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss) die Ausbildung von Myotubes innerhalb der Kultur erkannt werden. Für die durchgeführten Versuche wurden die resuspendierten Zellen in 12-well Zellkulturplatten kultiviert. Hierbei erfolgte eine Aussaat von ca. 40000 Zellen/ml Medium, deren Auszählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer statt fand.

|                                |            |         |
|--------------------------------|------------|---------|
| <b>Differenzierungsmedium:</b> | DMEM       | 99 ml   |
|                                | FCS        | 1 ml    |
|                                | Gentamicin | 5 µg/ml |

Zur Durchführung eines Differenzierungsexperimentes, wurden die Zellen auf Differenzierungsmedium umgestellt. Um den Einfluss des stromal cell-derived factor 1α (SDF-1α) zu ermitteln, erfolgte zum Zeitpunkt der Umstellung eine Stimulation mit 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml oder 100 ng/ml des SDF-1α. Zur Erforschung der Rezeptorbeteiligung wurden

die Zellen mit 100 nM des CXCR4 Blockers AMD3100 (Sigma Aldrich) oder 100 nM des CXCR7 Blockers CCX771 (Chemocentryx) vorbehandelt und anschließend mit SDF-1 $\alpha$  stimuliert. Danach verblieben die Kulturplatten bis zur Ernte im Brutschrank.

Um den Einfluss von SDF-1 $\alpha$  auf intrazelluläre Signalkaskaden zu ermitteln, wurden die Zellen für 24 h auf N2 (=Hungermedium) umgestellt. Danach fand für 8 min die Stimulation mit 10 ng/ml oder 100 ng/ml des SDF-1 $\alpha$  oder eine Vorbehandlung mit 100 nM AMD3100 oder 100 nM CCX771 und anschließend die SDF-1 $\alpha$  Stimulation statt.

|                                 |                |              |
|---------------------------------|----------------|--------------|
| <b>N2 = Hungermedium:</b>       | DMEM           | 50 ml        |
|                                 | F12            | 50 ml        |
|                                 | Transferrin    | 1 ml         |
|                                 | N2-Zusätze     | 500 $\mu$ l  |
|                                 | Gentamicin     | 5 $\mu$ g/ml |
| <b>N2-Zusätze (pro 100 ml):</b> | Insulin        | 100 mg       |
|                                 | Trijodthyronin | 100 mg       |
|                                 | Natriumselenit | 10 g         |
|                                 | Putrescin      | 5 g          |
|                                 | Progesteron    | 25 g         |

Nach Versuchsende erfolgte das Absaugen (Vakuumabsauger) des Mediums und einmaliges Waschen mit 1xPBS. Je nach anschließender Analyse erfolgte die methodenspezifische Ernte der C2C12-Zellen.

#### 3.3.3 Transfektion von C2C12-Zellen

Die Transfektion mit spezifischen siRNAs ist in den letzten Jahren eine wichtige Methode in der Molekular- und Zellbiologie geworden. Durch spezielle Transfektionsreagenzien ist es möglich, sie in lebende Zellen einzuschleusen und dadurch spezifisch die Expression bestimmter Gene zu hemmen. SiRNA's sind kurze, ca. 20bp lange, doppelsträngige RNA-Moleküle, welche eine komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA aufweisen (GILMORE et al. 2004).

In dieser Arbeit wurden die C2C12-Zellen mit kommerziell erhältlicher siRNA von Qiagen behandelt, welche die Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 hemmt (Rn CXCR4 6, Mm CXCR7 3). Die Anwendung der Transfektionsreagenz siPortAmine erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Hierfür wurden die Zellen vor der Transfektion auf 12-well Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 50% in Proliferationsmedium kultiviert. Die Umstellung erfolgte auf 496  $\mu$ l Differenzierungsmedium, 3  $\mu$ l Transfektionsreagenz und 1  $\mu$ l der siRNA für CXCR7 (40 nM) bzw. 1,25  $\mu$ l der siRNA für CXCR4 (50 nM). Dieses wurde nach 20h durch Proliferationsmedium ersetzt. Danach erfolgten die

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

Versuche wie bereits beschrieben. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe des Westernblots oder der Durchflusszytometrie bestimmt.

#### siRNA-Sequenz:

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| Rn CXCR4 6: | sense                               |
|             | 5'- GAG UCA GAA UCC UCA AGU UTT -3' |
|             | antisense                           |
|             | 5'- AAC UUG AGG AUU CUG ACU CTG -3' |
| Mm CXCR7 3: | sense                               |
|             | 5'- GCA ACU ACU CUG ACA UCA ATT -3' |
|             | antisense                           |
|             | 5'- UUG AUG UCA GAG UAG UUG CCA -3' |

#### 3.3.4 Westernblot

Die Probenernte erfolgte mit 70 µl 1x Probenpuffer (PB) pro well, wodurch sich die Zellen von der Zellkulturplatte lösten. Anschließend wurden diese in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Bei der Zellernte für Untersuchungen der Signalkaskaden musste dem 1xPB zusätzlich 100 µl/ml 1xPB Natriumorthovanadat (SOV) zugefügt werden, um eine Konservierung der phosphorylierten Bindungsstellen, durch die Inaktivierung ihrer Proteasen, zu erreichen. Durch das anschließende Kochen über 10 min bei 95°C (Thermomixer), erfolgte eine Hitzedenaturierung des Proteins und zusätzlich, durch enthaltenes Natriumdodecylsulfat (SDS), eine Überdeckung der Proteineigenladung. So konnten diese mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert werden. Die Proben wurden sofort weiterverwendet oder bei -30°C gelagert.

|                       |                    |        |
|-----------------------|--------------------|--------|
| <b>1xPB (100 ml):</b> | Tris/HCL (62,5 mM) | 100 ml |
|                       | SDS                | 2 g    |
|                       | Saccharose         | 10 g   |

→ zum Lösen unter Rühren auf 60°C erwärmen

→ pH-Wert auf 6,8 einstellen

#### Proteinkonzentrationsbestimmung

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration wird vorgenommen, um gleiche Proteinmengen der Proben in der SDS-Page auftragen zu können. Hierbei erfolgt im ersten Schritt eine Biuretreaktion, bei welcher zwei Peptidbindungen mit vorhandenen zweiwertigen Kupferionen einen Komplex bilden. Im zweiten Schritt kommt es zur Reduktion des Kupfer-II-Ions zu einwertigem Kupfer, welches wiederum durch Reduktion der Bicin-

chonsäure (BCA) einen intensiv-rosa Komplex bildet. Die Intensität wird durch Photometrie gemessen. In dieser Arbeit wurde die Bestimmung mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits durchgeführt. Hierbei erfolgte zuerst der Auftrag eines Proteinstandards (je 25 µl)(Albuminstandard, im Kit enthalten) in Doppelreihe auf einer 96 well Mikrotiterplatte. Danach wurden die jeweiligen Proben (2,5 µl Probe in 22,5 µl 1xPB) pipettiert. Zum Schluß erfolgte die Zugabe von 200 µl der BCA-Reagenz (Lösung A+B, 1:50) zu jedem well. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C konnte die Intensität der Färbung photometrisch mit dem SpectraMax Plus384 (Molecular Devices) bestimmt werden. Die erhobenen Daten ließen sich mit Excel (Microsoft Office 2007) auswerten.

#### Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Diese Methode eignet sich zur Ermittlung der molekularen Masse von Proteinen, da eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der relativen Wanderungsgeschwindigkeit eines SDS-Protein-Komplexes vorhanden ist (JANSOHN 2007). Im diskontinuierlichen System besteht das verwendete Minigel aus einem oben angeordneten Sammelgel und einem darunter liegendem Trenngel (8 % oder 10 %), was eine schärfere Bandentrennung zur Folge hat. Hierfür wurden 2 Glasplatten eingespannt und als erstes das Trenngel eingefüllt. Sofort fand eine Übersichtung mit einem Wasser:Isopropanol-Gemisch (1:1) statt, um eine glatte Polymerisationsgrenze zu erreichen. Nach ca. 30 min - 40 min war das Trenngel fest. Danach erfolgt das Gießen des Sammelgels, in welches der taschenbildende Kamm eingesetzt wurde.

|                          |                  |         |
|--------------------------|------------------|---------|
| <b>Trenngel (1,5 M):</b> | Tris/Base        | 90,85 g |
|                          | SDS              | 2 g     |
|                          | H <sub>2</sub> O | 500 ml  |

|                           |                  |         |
|---------------------------|------------------|---------|
| <b>Sammelgel (0,5 M):</b> | Tris/Base        | 30,29 g |
|                           | SDS              | 2 g     |
|                           | H <sub>2</sub> O | 500 ml  |

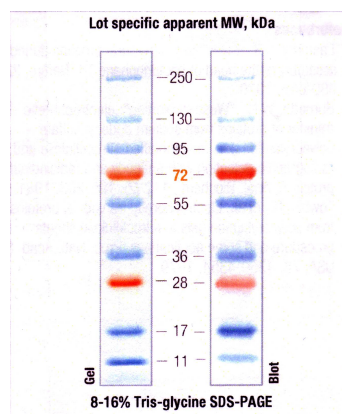
| <b>Minigel (3x):</b>     | Trenngel 8 % | Trenngel 10 % | Sammelgel |
|--------------------------|--------------|---------------|-----------|
| Aqua dest.               | 5,9 ml       | 5,4 ml        | 5,8 ml    |
| Trennpuffer              | 2,8 ml       | 2,8 ml        |           |
| Sammelpuffer             |              |               | 2,4 ml    |
| Acrylamid (Rotiphotrese) | 2,2 ml       | 2,8 ml        | 1,2 ml    |
| TEMED                    | 5,5 µl       | 5,5 µl        | 9,5 µl    |
| APS                      | 55 µl        | 55 µl         | 95 µl     |

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

|             |                   |       |
|-------------|-------------------|-------|
| <b>APS:</b> | Ammoniumpersulfat | 5 g   |
|             | H <sub>2</sub> O  | 50 ml |

Nach Entfernen des Kamms aus dem Sammelgel wurden die Probentaschen gespült, das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und der Behälter mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die SDS-Page vollzog sich nach der Methode von Laemmli (LAEMMLI 1970). Hierfür wurden im Schnitt 10 µl der zu analysierenden Proben mit 5 µl des Laemmli-Puffers versetzt und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Das dort enthaltene 2-Merkaptoethanol verringert intra- und intermolekulare Disulfidbindungen, so dass der Einfluss der Form der Proteine auf die Größentrennung verringert wird. Zusätzliches SDS sorgte erneut für die Überdeckung der Eigenladung. Anschließend wurden die Proben 30 sek bei 8000 rpm zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160 V und wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte. Zur Orientierung während der Auftrennung und zur späteren Einordnung des Molekulargewichts wurden zusätzlich 2,5 µl des PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladders aufgetragen.



**Abbildung 3.1:** PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas).

|                        |                          |        |
|------------------------|--------------------------|--------|
| <b>Laemmli-Puffer:</b> | Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8) | 10 ml  |
|                        | SDS                      | 0,8 g  |
|                        | 2-Merkaoptoethanol       | 0,4 ml |
|                        | Glycerin                 | 2,3 ml |
|                        | Bromphenolblau           | 2 g    |

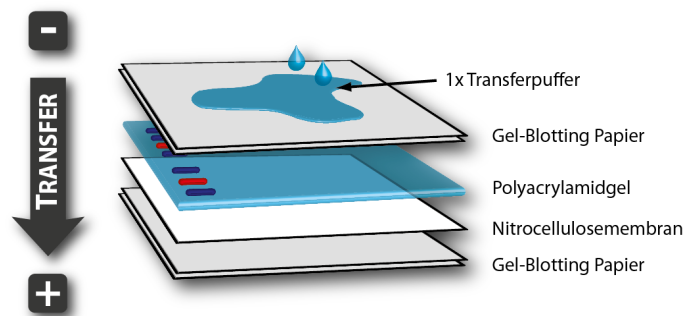
→ mit Aqua dest. auf 20 ml auffüllen

|                                    |           |            |
|------------------------------------|-----------|------------|
| <b>Elektrophoresepuffer (10x):</b> | TRIS/Base | 30,29 g/l  |
|                                    | Glycin    | 187,67 g/l |
|                                    | SDS       | 10 g/l     |

→ vor der Zugabe von SDS pH-Wert auf 8,7 einstellen

#### Transfer

Um Proteine mit spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern nachweisen zu können, mussten die nun aufgetrennten Proteinbanden im sogenannten Westernblot aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman) transferiert („geblottet“) werden. Der Westernblot lief nach dem Semi-Dry-Verfahren ab. Hierzu wurden 4 Lagen Gel-Blotting-Papier und eine Lage Nitrocellulosemembran in 1x Transferpuffer getränkt. Zuerst fand das Auflegen von 2 Lagen Blotting-Papier auf die Anode der Blot-Apparatur statt. Darauf folgte dann die Nitrocellulosemembran mit dem luftblasenfrei aufgebrachten Trenngel. Den Kontakt zur Kathode bildeten 2 weitere Lagen des Blotting-Papiers. Nachdem Aufschichten des sogenannten Blot-Sandwiches, wurde der als Kathode fungierende Deckel der Blot-Apparatur aufgelegt. Der Transfer vollzog sich für 40 min bei konstanten 15 V. Hierbei sorgte ein senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegtes elektrisches Feld dafür, dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wanderten und dort auf Grund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2:** Aufbau des Blot-Sandwiches während des Transfers.

|                              |           |          |
|------------------------------|-----------|----------|
| <b>Transferpuffer (10x):</b> | TRIS/Base | 87,0 g/l |
|                              | Glycin    | 43,5 g/l |
|                              | SDS       | 5,55 g/l |

|                             |                      |        |
|-----------------------------|----------------------|--------|
| <b>Transferpuffer (1x):</b> | Transferpuffer (10x) | 100 ml |
|                             | Methanol             | 200 ml |
|                             | Aqua dest.           | 700 ml |

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

Nach dem Transfer erfolgte die Überprüfung der Qualität und der Beladung der einzelnen Proteinbanden durch eine 1-minütige Inkubation mit Ponceau S. Anschließend wurde die Membran für 1 h in einer 3 % bovinen Serumalbumin-Lösung (BSA) auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran zu blockieren.

|                         |                     |      |
|-------------------------|---------------------|------|
| <b>Ponceau S (10x):</b> | Ponceau S           | 2 g  |
|                         | Trichloressigsäure  | 30 g |
|                         | 5-Sulfosalicylsäure | 30 g |

→ mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

|                        |           |        |
|------------------------|-----------|--------|
| <b>Blockierlösung:</b> | BSA       | 3 g    |
|                        | TBS/Tween | 100 ml |

#### Immunhistochemischer Nachweis transferierter Proteine

Der immunhistochemische Nachweis transferierter Proteine wurde mit deren spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Inkubation der Membran lief, unter leichtem Schwenken, mit den entsprechenden Primärantikörpern ab: MF20, CXCR4, CXCR7, Myogenin, GAPDH, Phospho-p44/42 MAPK, p44/42 MAPK, Phospho-PKCzeta/lambda und Phospho-PKC (pan). Diese wurden in 1x TBS/Tween verdünnt und über Nacht bei 4°C auf der Membran belassen. Danach folgten drei Waschschrte mit 1x TBS/Tween á 10 min, sowie die Inkubation mit dem dazugehörigen peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper (Donkey-Anti-Mouse, Donkey-Anti-Rabbit, Goat-Anti-Rat). Diese wurden alle 1:1000 in 1x TBS/Tween verdünnt und die Membran unter leichtem Schwenken 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt schlossen sich erneut drei Waschschrte mit 1x TBS/Tween á 10 min an.

|                   |           |          |
|-------------------|-----------|----------|
| <b>TBS (10x):</b> | TRIS/Base | 24,2 g/l |
|                   | NaCl      | 80 g/l   |

|                        |                 |       |
|------------------------|-----------------|-------|
| <b>TBS/Tween (1x):</b> | TBS/Tween (10x) | 1 l   |
|                        | Tween           | 10 ml |

→ mit Aqua dest. auf 10 l auffüllen

→ pH-Wert mit Salzsäure (Roth) auf 7,6 einstellen

Der Nachweis der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurde mit Hilfe der Lumineszenz-Methode (ECL, Enhanced Chemiluminescence) durchgeführt. Die ECL ist ein häufig angewendetes Verfahren zur Detektion von Antigenen, welche mit einem HRP-konjugierten (horseradish peroxidase) Antikörper gekoppelt sind. Hierbei wird die Membran 30 sek mit einem 1:1 Gemisch von Lösung A und Lösung B (ECL Westernblot De-

tection Reagents, GE Healthcare) inkubiert und anschließend das Chemilumineszenzsignal durch Schwärzung eines Röntgenfilms (Fuji Film Europe GmbH) sichtbar gemacht. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) durch Wasserstoffperoxid, wodurch 3-Aminophthalsäure und Stickstoff entstehen. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht (425nm) freigesetzt, welches die Belichtung des Filmstreifens bewirkt.

### Strippen

Um ein zweites Protein auf der Membran nachweisen zu können, wurde diese 15 min mit Strip-Puffer behandelt. Bei diesem Vorgang kommt es zur Spaltung der Bindungen zwischen Primär- und Sekundärantikörper, aber auch innerhalb der Antikörper selbst. Dadurch sind diese in der ECL-Reaktion nicht mehr nachweisbar. Zur Ladungskontrolle eines jeden Blots und um eventuell vorhandene unterschiedliche Proteinmengen bei der Auswertung auszugleichen, fand immer eine Kontrolle mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) statt. Dieses Enzym eignet sich, da es unentbehrlich für die Glykolyse ist und deshalb so gut wie keinen Schwankungen innerhalb der Zelle unterliegt. Im Falle eines Phosphorylierungsexperimentes wurden die entsprechenden Pan-Antikörper (hier: Erk 1/2, pkc zeta pan) als Kontrolle verwendet. Zum Nachweis schloß sich das erneute Durchführen des Antikörper-Inkubationsprotokolls wie zuvor beschrieben an.

|                      |                   |        |
|----------------------|-------------------|--------|
| <b>Strip-Puffer:</b> | 2-Merkaptoethanol | 7 ml   |
|                      | Tris/HCl          | 167 ml |
|                      | SDS (10 %)        | 200 ml |

→ mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen und pH 6,8 einstellen

### 3.3.5 Ko-Immunpräzipitation

Mit Hilfe von Protein A/G-Sepharose Beads können ganz gezielt mit spezifischen Antikörpern markierte Proteine aus einem Proteingemisch präzipitiert werden. Die kugeligen, unlöslichen Zuckerbeads sind mit Protein A aus Staphylokokken- und Protein G aus Streptokokkenstämmen ummantelt. Diese Bakterienproteine sind in der Lage spezifisch die Fc-Enden von IgA-, IgM- und IgG-Antikörpern zu binden. Da die ausgefällten Proteine mit ihren Interaktionspartnern (Kopräzipitate) präzipitiert werden, eignet sich diese Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Zuerst erfolgte das Ernten der kultivierten Zellen mit kaltem NP-40-Lysepuffer und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde ein sogenannter „Pre-clearing step“ durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl der Probe mit 10 µl eines 1:1 Gemisches aus 1xPBS und Protein A/G-Sepharose Beads über



### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

1 h auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Durch unspezifische Bindungen an Zelldetritus diente dieser Schritt einer ersten Auffreinigung der Probe. Nach dem Abzentrifugieren für 5 min bei 4°C und 10 000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Reagiergefäß überführt und weiterverwendet. Der nun zugegebene Primärantikörper (Verdünnung 1:200) richtete sich entweder gegen MyHC oder einer der beiden Rezeptoren CXCR4 oder CXCR7. Dieser inkubierte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Am nächsten Tag wurde der „Fishing“-Schritt durchgeführt. Hierzu fand eine erneute Inkubation der Proben mit den einfach verdünnten Protein A/G Sepharose Beads über 4 h bei 4°C unter leichtem Schwenken statt. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit 400 µl kaltem NP-40-Lysepuffer. Das nach dem letzten Zentrifugieren (3 min, 10 000 rpm, 4°C) entstandene Pellet wurde in 50 µl 1x PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -30°C eingefroren. Die Analyse erfolgte durch einen Westernblot, bei dem als Primärantikörper der in der Präzipitation verwendete Antikörper (Kontrolle) oder einer eines eventuell interagierenden Proteins aufgetragen wurde.

|                               |                      |                                          |
|-------------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| <b>NP-40-Puffer</b> (100 ml): | Tris (20 mM, pH 7,5) | 0,0242 g                                 |
|                               | NaCL (100 mM)        | 0,574 g                                  |
|                               | EDTA (0,5 mM)        | 0,0146 g                                 |
|                               | NP-40                | 0,5 %                                    |
|                               | Protease-Hemmer      | 10 µg/ml (erst kurz vor Lyse hinzugeben) |

#### 3.3.6 Durchflusszytometrie (engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting oder FACS)

Expressionsveränderung von CXCR4, CXCR7 und MyHC in proliferierenden und differenzierten C2C12-Zellen wurden mittels der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen.

##### Allgemein

Die FACS erlaubt es, verschiedene physikalische Eigenschaften von Zellen zu messen und zu analysieren. Dabei werden die relative Zellgröße, die relative Granularität und die relative Fluoreszenzintensität ermittelt. Die Zellen werden durch eine feine Kapillare gesaugt, passieren dort einen Laserstrahl und emittieren je nach Ihrer Größe und Granularität ein unterschiedliches Streulicht. Das sogenannte „Vorwärtsstreulicht“ (FSC, Forward Light Scatter) gibt eine Aussage über die Größe der Zellen, wohingegen das „Seitwärtsstreulicht“ (SSC, Side Scatter) die Granularität der Zellen detektiert. Da die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert werden, lassen sich die Expression von Oberflächenproteinen bzw. intrazellulären Molekülen quantitativ analysieren.

### Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung werden nacheinander zwei spezifische Antigen-Antikörper Reaktionen durchgeführt. Als erstes wurden die Zellen mit 250 µl des FACS-Puffers pro Well einer 12-well Platte geerntet. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über 30 min auf Eis. Beim Nachweis von intrazellulären Molekülen wie z.B. MyHC war eine 15 minütige Permeabilisation der Zellmembran mit Saponin 0,5 % notwendig. Es schloß sich ein zweimaliger Waschvorgang mit FACS-Puffer und jeweiliger Zentrifugation (2500 rpm) und Verwerfung des Flüssigkeitsüberstandes an. Danach folgte die 15 minütige Inkubation mit den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tab. 3.1), wiederum auf Eis und in einem dunklen Behälter. Nach einer anschließenden Waschprozedur, wurden die Zellen in 2 % FACS/PFA-Lösung aufgenommen und am nächsten Tag mit dem Durchflußzytometer (FACS-Calibur, Becton Dickinson) analysiert. Bis dahin verblieben die Zellsuspensionen in einem dunklen Behälter bei 4°C.

| Fluorochrome | Emissionsmaximum |
|--------------|------------------|
| PE           | 580 nm           |
| FITC         | 520 nm           |

Tabelle 3.1: Fluorochrome und deren Emmissionsspektren

|                     |             |        |
|---------------------|-------------|--------|
| <b>FACS-Puffer:</b> | BSA         | 20 g   |
|                     | Natriumazid | 500 µl |

→ mit 1xPBS auf 1 l auffüllen

### Auswertung

Die Auswertung der gemessenen Rohdaten wurde mit Hilfe von WinMDI Programm (Version 2.8, Joseph Trotter, Scipps Research Institute, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Zu allererst wurde eine mononukleäre Zellpopulation definiert, welche weder tote Zellen noch Zellklumpen beinhaltete. In der FSC/SSC-Darstellung wurde diese Zellfraktion mit Hilfe eines „Gates“ eingegrenzt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensitäten ausgewertet (Abb. 3.3 A). Veränderungen der Expression von CXCR4, CXCR7 und MyHC wurden als Histogramme dargestellt. In diesem Diagramm stellt die X-Achse die Fluoreszenzintensität der o.g. Antigene dar, die Y-Achse die Anzahl der Zellen. Dabei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen (Antigene), d.h. je mehr Bindungsstellen vorhanden sind desto heller leuchtet die Zelle. Im Histogramm drückt sich das in einem höheren Median bzw. Mittelwert aus. Damit die Fluoreszenzin-

### 3. MATERIAL UND METHODEN

tensität der untersuchten Zellen richtig bewertet wird, wurden ungefärbte Kontrollen und Sekundärantikörper-Kontrollen mit gemessen (Abb. 3.3 B).

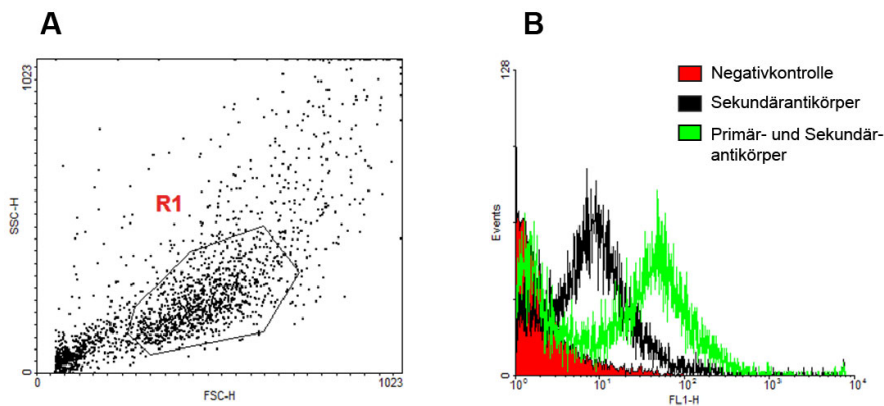


Abbildung 3.3: Auswertung FACS.

Um die CXCR4 und CXCR7 positiven Subpopulationen während der Proliferation und Differenzierung zu identifizieren, wurden C2C12 Zellen gleichzeitig mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen angefärbt. Da hier zwei verschiedene Parameter gleichzeitig analysiert wurden, reichte eine einfache Histogrammdarstellung nicht aus. Stattdessen wurde ein zweidimensionales Punktediagramm gewählt, bei der die Y-Achse als PE-Fluoreszenz (CXCR7) und die X-Achse als FITC-Fluoreszenz definiert wurde. Um die Häufigkeiten der ungefärbten, der nur CXCR4 bzw. nur CXCR7 positiven Zellen und der CXCR4/CXCR7 doppelpositiven Zellen zu bestimmen, wurden im nächsten Schritt Quadranten definiert. Die Quadranten wurden anhand der Negativkontrollen so gesetzt, daß eine eindeutige Unterscheidung zwischen negativen und positiven Zellen möglich war (Abb. 3.4).

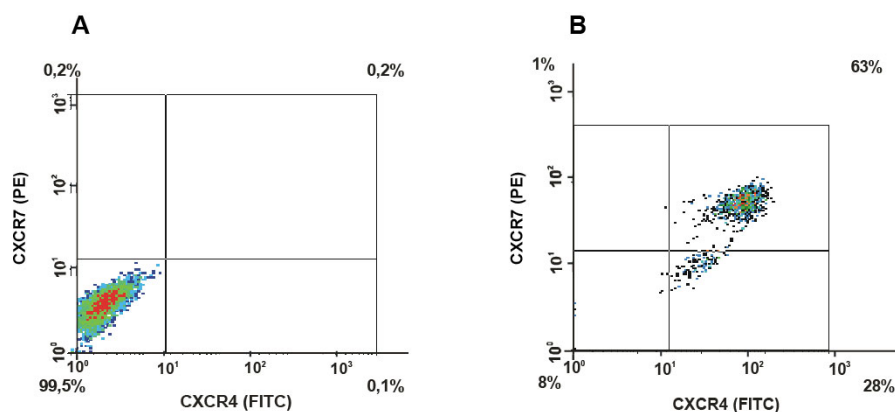


Abbildung 3.4: Auswertung FACS.

### **3.3.7 Immunzytochemische Färbungen von C2C12-Zellen**

Für das Anfärben von C2C12-Zellen wurden diese auf runden Deckgläschen, innerhalb eines Wells einer 12-well Zellkulturplatte, ausgesät. Als erstes fand eine Fixierung der Zellen über 15 min mit 4 % PFA und anschließendes Waschen mit 1xPBS statt. Sollte MyHC nachgewiesen werden, mussten die Zellen 30 min mit einer 0,05 % Saponinlösung inkubiert werden. Bei einem Nachweis der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7, entfiel dieser Schritt. Daraufhin wurden die entsprechenden Primärantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C auf den Zellen belassen. Nach zwei erneuten Waschschritten fand die Inkubation mit dem Sekundärantikörper statt.

#### **Fluoreszenzfärbung**

Bei Fluoreszenzfärbungen wurde der Primärantikörper MF20 mit Goat-Anti-Mouse Cy5, CXCR4 und CXCR7 mit Goat-Anti-Rabbit Alexa 488 behandelt. Das Eindeckeln der Deckgläschen wurde mit Dako Glycergel Mounting Medium durchgeführt, welches zusätzliches 4',6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI) für die Kernfärbung enthielt. Dafür wurden diese mit der Oberseite nach unten auf Objektträger gelegt, leicht angedrückt und getrocknet. Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2, die Aufnahme und Überlagerung der einzelnen Farbbilder mit dem Programm AxioVision Rel. 4.8.

#### **AEC-Färbung**

Bei 3-Amino-9-Ethylcarbazol-Färbungen (AEC) werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet. Für den MF20-Primärantikörper handelte es sich um einen Horse-Anti-Mouse Sekundärantikörper von Vector Laboratories. Danach erfolgte das Auftragen eines Avidin-Biotin-Komplex (Vectostain Elite ABC-Kit) über 2 h, welcher durch hohe Bindungsaffinitäten das Färberesultat verbessert. Zuletzt fand, nach erneutem Waschen, die Inkubation mit dem Peroxidase Substrate Kit AEC statt. Der an das Biotin gekoppelten Peroxidase wird Wasserstoff als Substrat angeboten. Die daraus freiwerdenden Protonen oxidieren das enthaltene AEC zu einem rostroten Endprodukt und erzeugen somit die spezifische Färbung. Schließlich wurden die Deckgläser mit Eindeckmedium versehen und wie oben beschrieben konserviert. Das Ergebnis wurde mit der Durchlichtfunktion des Fluoreszenzmikroskop, Axioplan 2 (Zeiss) betrachtet und mit Hilfe des Programms AxioVision Rel. 4.8 dokumentiert.

#### 3.3.8 Immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten

##### Herstellung von Gefrierschnitten

Die Herstellung von Gefrierschnitten erfolgte von Mäusen der Altersklassen E18, P3, P16 und A (Adult). Für die Entnahme der Embryonen (E18) wurde das Muttertier in einer CO<sub>2</sub>-Kammer getötet und entlang der Linea alba eröffnet. Den entnommenen Tieren wurde der Kopf abgetrennt und der Körper für 3 Tage in eine aufsteigende Saccharose-Konzentrationsreihe gebettet (Saccharose: 15 %, 17,5 %, 20 %). Das Tieffrieren des gesamten Körpers eignete sich in verdunstendem Flüssigstickstoff. Das verwendete P3 Tier wurde durch zervikale Dislokation getötet, das P16 Tier in der CO<sub>2</sub>-Kammer. Danach fand jeweils die Abnahme der hinteren Extremitäten statt, welche ebenfalls für 3 Tage in eine aufsteigende Saccharose-Konzentrationsreihe gebettet wurden. Das Tieffrieren dieser Gliedmaßen erfolgte ebenfalls in verdunstendem Flüssigstickstoff. Das adulte Tier (männlich) wurde in der CO<sub>2</sub>-Kammer getötet. Aufgrund der Größenverhältnisse empfahl sich, nur ein Muskelpaket aus dem Bereich des Oberschenkels zu entnehmen. Nach einmaligem Wälzen in Talkumpuder wurde dieses direkt in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Da die Wildtyp- und die mdx-Mäuse aus dem Herzzentrum der Universität Leipzig für mehrere Fragestellungen genutzt wurden, erhielt unsere Arbeitsgruppe die unvorbehandelten, jedoch bereits in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Musculi quadriceps femores der jeweiligen Untersuchungstiere. Alle vorhandenen Proben wurden in Tissue Tek eingebettet und am Kryostat zu 12 µm dicken Schnitten verarbeitet. Diese wurden auf L-Lysin beschichtete Objektträger gezogen und bis zur Färbung bei -30°C gelagert.

Parallel zur Gewebepräparation für die Kryoschnittkulturen konnten Muskelproben zur Analyse im Westernblot entnommen werden. Hierzu wurden reiskorngroße Muskelstücke freipräpariert, in 100 µl 1xPB gegeben und mit einer Schere vorzerkleinert. Danach wurden die Proben 15 sek mit 2 Zyklen/sek sonifiziert und anschließend 10 min bei 95°C gekocht. Die Lagerung über längere Zeit erfolgte bei -30°C.

##### Fluoreszenzfärbung

Für die Färbung wurden die Gewebeschnitte 10 min luftgetrocknet und mit einem Pap Pen umrandet. Danach fand eine Fixierung mit 4 % PFA für 15 min statt, an welche sich zwei Waschschritte über 5 min mit 1xPBS anschlossen. Da MyHC intrazellulär lokalisiert ist, war eine zusätzliche Behandlung mit Triton X über 10 min nötig. Nach Waschen mit 1xPBS blockte 2 % Ziegen Serum über 30 min unspezifische Bindungsstellen. Nach erneutem Spülen folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Hierbei wurden stets Doppelmarkierungen durchgeführt: MyHC/CXCR4, MyHC/CXCR7 und

MyHC/SDF-1 $\alpha$ . Am nächsten Tag erfolgte nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Für den Nachweis von MyHC und Fibronectin wurde Goat-Anti-Mouse Cyanin2, für Laminin Goat-Anti-Mouse Alexa 488 und für CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$  je Goat-Anti-Rabbit Cyanin3 für 2 h verwendet. Mit wachsenden Alter findet sich in vielen Geweben ein erhöhter Anteil an Lipofuscin, welches beim Abbau roter Blutkörperchen entsteht. Dies hat die negative Eigenschaft, dass die Eigenfluoreszenz der zu untersuchenden Gewebe stark erhöht wird. Um diesen Effekt in den P16 und A-Schnitten zu reduzieren, erwies sich eine zusätzliche Inkubation mit einer Sudanschwarz-Lösung über 15 Minuten als hilfreich (MULISCH und WELSCH 2010). Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit Dako Glycergel Mounting Medium, welches zusätzliches DAPI enthielt, versehen und mit einem Deckglas konserviert. Die spezifische Kernfärbung war somit der letzte Schritt. Die Beurteilung der Fluoreszenzschnitte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 und die Aufnahme und Überlagerung der einzelnen Farbbilder mit dem Programm AxioVision Rel. 4.8 beendete die Analyse der Gewebsschnitte. Für detailreichere Aufnahmen wurden Bilder der SDF-1 $\alpha$  gefärbten Kryoschnitte am CLSM: LSM 510/Axiomvert 100, Zeiss mit Hilfe des Programmes LSM Image Browser, Zeiss aufgenommen. An dieser Stelle möchte ich Fr. Urszula Grabiec erwähnen, die mich bei den Aufnahmen hilfreich unterstützte und technische Details regelte.

|                             |               |        |
|-----------------------------|---------------|--------|
| <b>Sudanschwarz-Lösung:</b> | Sudanschwarz  | 0,25 g |
|                             | Ethanol (70%) | 50 ml  |

- unter ständigem Rühren auf 50°C erwärmen
- nach 2 h mit Aqua. dest. auf 250 ml auffüllen und weiter erwärmen
- durch einen Faltenfilter filtrieren und direkt verwenden

### 3.3.9 PCR

Die genomische DNA, welche in der polymerase chain reaction (PCR) verwendet wurde, stammte jeweils aus dem Oberschenkel einer E18, P3, P16 und A Maus. Zur Entnahme wurde das Phire Animal Tissue Direct PCR Kit verwendet. Hierbei wurde mit Hilfe eines Stanzers ein Bioptat aus der entsprechenden Region entnommen und dieses mit 20  $\mu$ l eines Dilution Buffers und 0,5  $\mu$ l eines DNARElease Additives versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und 2 min Kochen bei 98°C konnte der abzentrifugierte Überstand eingefroren oder direkt für die PCR verwendet werden. Mit Hilfe der PCR ist es möglich, enzymatisch, bei Vorhandensein geeigneter Oligodesoxynukleotid-Primer, bestimmte DNA-Bereiche zu amplifizieren. Das Prinzip der PCR basiert auf der DNA-Doppelstrangdenaturierung (denaturation), der Anbindung beider Primer an ihre jeweilige

### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

Matrize (annealing) und der Verlängerung der Komplementärstränge an der entsprechenden Matrize durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Dieser Zyklus wurde bis zu 35 mal von dem Mastercycler gradient wiederholt, in welchem alle PCR-Versuche durchgeführt wurden. Die Reaktion erfolgte im 20 µl Ansatz unter Verwendung des BioTaq PCR Kits.

|                        |                             |         |
|------------------------|-----------------------------|---------|
| <b>Standardansatz:</b> | H <sub>2</sub> O            | 13,6 µl |
|                        | 10x NH <sub>4</sub> -Buffer | 2,0 µl  |
|                        | MgCl <sub>2</sub> (50mM)    | 1,0 µl  |
|                        | Primer 1 (sense)            | 0,8 µl  |
|                        | Primer 2 (antisense)        | 0,8 µl  |
|                        | dNTP                        | 0,4 µl  |
|                        | BioTaq DNA Polymerase       | 0,4 µl  |
|                        | DNA                         | 1,0 µl  |

|                          |                 |      |        |
|--------------------------|-----------------|------|--------|
| <b>Standardprogramm:</b> | Start           | 95°C | 3 min  |
|                          | Denaturierung   | 95°C | 30 sek |
|                          | Annealing       | x    | 30 sek |
|                          | Extension       | 72°C | 30 sek |
|                          | Schlussexension | 72°C | 10 min |
|                          | Ende            | 4°C  |        |

Verwendung fanden Primer (je sense und antisense) für CXCR4, CXCR7 und das „house keeping“-Gen GAPDH. Die Annealingtemperaturen für die jeweiligen Primerpaare wurden mit Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt. Hierbei erwiesen sich bei CXCR4 54°C und bei CXCR7 52,5°C als optimal.

#### Primersequenz:

|        |                                                                                                    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CXCR4: | sense<br>5´ - AGT GGC TGA CCT CCT CTT TGT -3´<br>antisense<br>5´ - GCC CAC ATA GAC TGC CTT TTC -3´ |
| CXCR7: | sense<br>5´ - TCA CCT ACT TCA CCG GCA CC -3´<br>antisense<br>5´ - ACA TGG CTC TAG CGA GCA GG -3´   |
| GAPDH: | sense<br>5´ - CCG TGT TCC TAC CCC CAA TG -3´<br>antisense<br>5´ - GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA -3´  |

Die Reaktionsgefäße wurden aus dem Mastercycler entnommen und bis zur Gelelektrophorese der Proben bei 4°C aufbewahrt.

### Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte elektrophoretisch anhand ihrer Größe in einem 1%igem Agarosegel. Zur Herstellung des Geles wurde 1 g Agarose in 100 ml Elektrophoresepuffer (1x TAE) bis zum vollständigen Lösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt. Durch die Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid, welches sich zwischen die Basen der DNA lagert, wurde deren Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) stark erhöht. Das flüssige Agarose-TAE-Gemisch erstarrte in einer Flachbettapparatur. Ein eingesetzter Kamm sorgte für die Bildung der Probenaschen. Jede DNA-Probe wurde mit 2 µl Probenpuffer versetzt, in die Taschen des erstarrten Gels geladen und bei 100 V über 45 min in 1x TAE elektrophoretisch aufgetrennt. Zur späteren Größenanalyse der aufgetrennten Produkte liefen zusätzlich 6 µl des Bench Top Ladders DNA in der ersten Probenasche mit. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe in einem Multi Image Light Cabinet und dem Programm AlphaImager 2200.

|                          |                      |         |
|--------------------------|----------------------|---------|
| <b>TAE-Puffer (50x):</b> | EDTA (0,5 M, pH 8,0) | 100 ml  |
|                          | TRIS/Base            | 242 g   |
|                          | Eisessig             | 51,1 ml |

→ mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

|                              |                            |        |
|------------------------------|----------------------------|--------|
| <b>Probenpuffer (10 ml):</b> | EDTA-Stock (0,5 M, pH 8,0) | 0,8 ml |
|                              | Glycerin                   | 5 ml   |
|                              | H <sub>2</sub> O           | 4,2 ml |
|                              | Bromphenolblau             | 2 g    |

#### 3.3.10 Statistische Analyse

Die Versuchsauswertung erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) von unabhängigen Experimenten. Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse, one-way ANOVA ausgewertet. Ergab diese signifikante Unterschiede folgte eine Posttest-Analyse nach Tukey (für gleiche Stichprobenumfänge) oder Bonferroni (für ungleiche Stichprobenumfänge), wobei ein P-Wert für  $< 0,05$  als signifikant angesehen wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0.



### 3. MATERIAL UND METHODEN

---

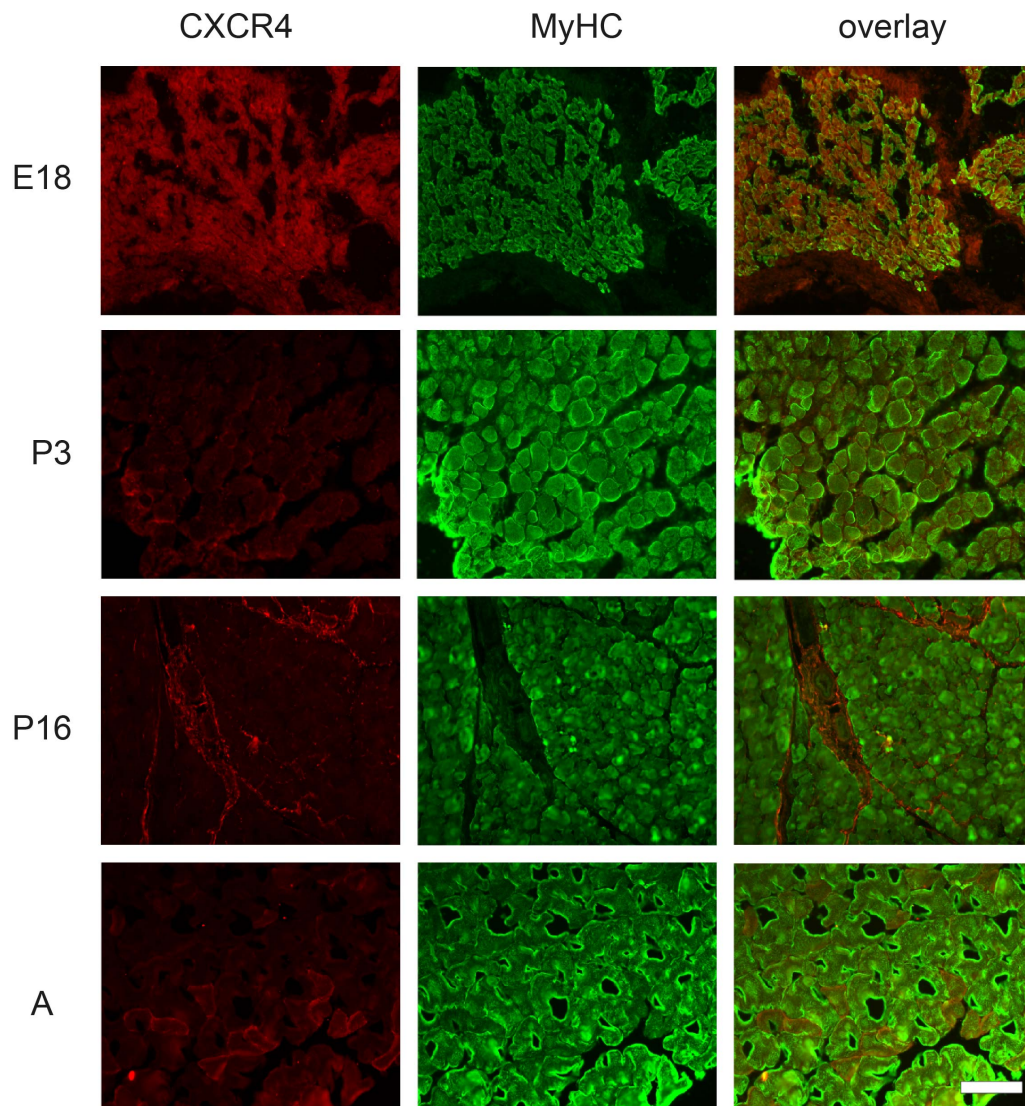
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der Muskulatur während der Entwicklung

#### 4.1.1 Immunhistochemie

##### CXCR4

Die bisherigen Untersuchungen von ÖDEMIS et al. (2005) zeigten eine Expression des CXCR4 in der embryonalen Gliedmaßenmuskulatur. Der weitere Expressionsverlauf in der postnatalen Phase bzw. in adulten Tieren ist jedoch nicht charakterisiert.



**Abbildung 4.1: CXCR4- Expression *in vivo*.** Immunhistochemischer Nachweis von CXCR4 und MyHC an Muskelschnitten aus dem Oberschenkel bzw. des M.quadriceps femoris von Mäusen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Der CXCR4 (rot) wird sehr deutlich bei E18 exprimiert, die Überlagerung zeigt die Lokalisation in der Muskulatur (MyHC = grün). Mit zunehmenden Alter sinkt die Rezeptorexpression. Im adulten Tier ist immunhistochemisch kein CXCR4 mehr nachweisbar. Maßstab: 100  $\mu$ m.

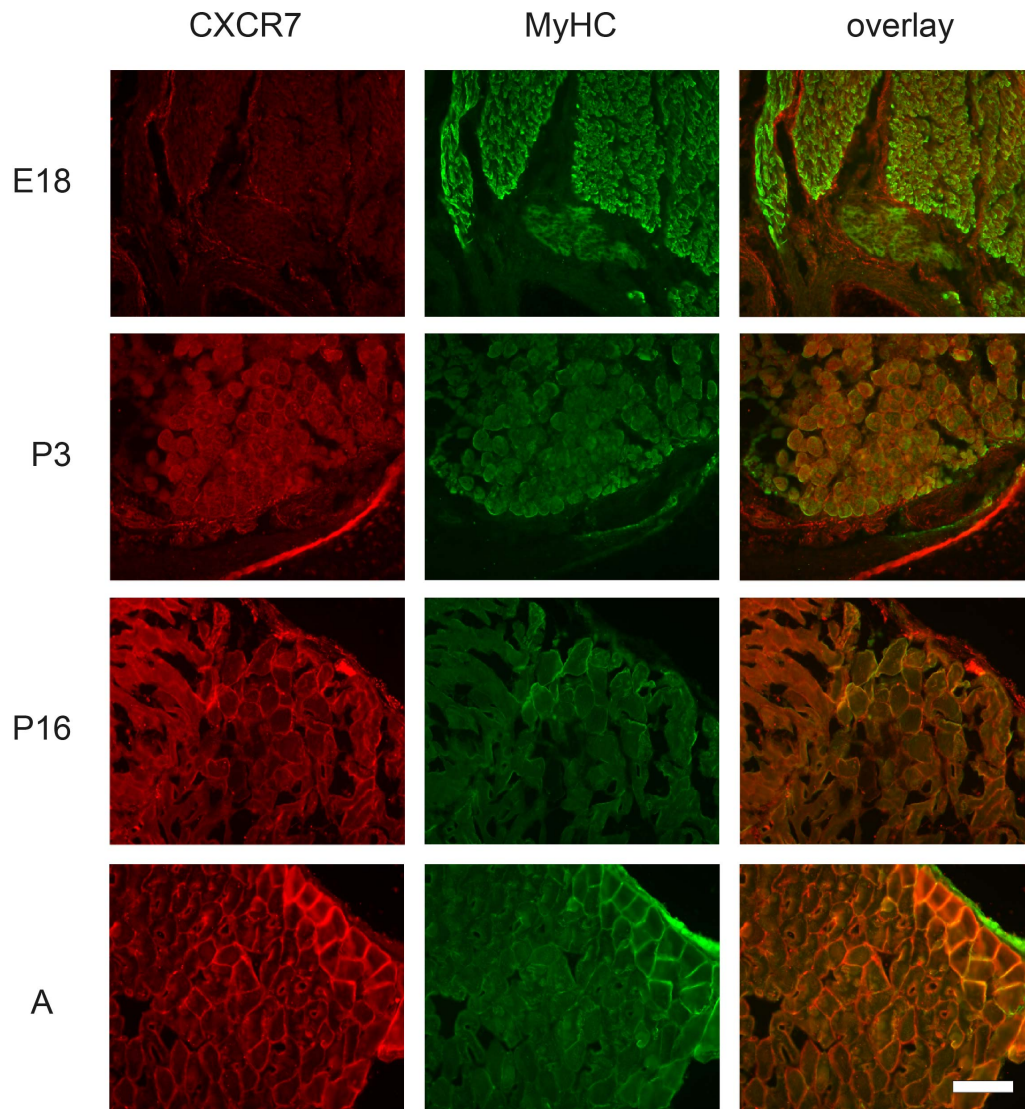
## 4. ERGEBNISSE

---

Um die muskelspezifische Expression des Rezeptors zu untersuchen, wurde zuerst eine Immunhistochemie an Kryoschnitten durchgeführt. Die Präparation des Oberschenkels bzw. des M. quadriceps femoris erfolgte bei C57BL/6-Mäusen in der prä- (18. Embryonaltag (E18)) und postnatalen Entwicklung (3. Lebenstag (P3), 16. Lebenstag (P16)) und von adulten Tieren (A). Die durchgeführte Doppelmarkierung der Schnitte mit einem Antikörper gegen CXCR4 und MyHC, zeigte bei E18 eine starke Fluoreszenzintensität des Antikörpers gegen CXCR4 (Abb. 4.1). Diese resultiert aus einer hohen CXCR4-Expression in der Muskulatur. Im Verlauf der Entwicklung änderte sich diese Expression. Es war eine deutliche Abnahme des CXCR4 bei P3 und P16 zu erkennen. Im adulten Tier ist der Rezeptor nicht mehr nachweisbar (Abb. 4.1).

### CXCR7

Als zweites erfolgte eine Doppelmarkierung der Schnitte mit Antikörpern gegen CXCR7 und MyHC (Abb. 4.2). Im Gegensatz zum CXCR4 ist bei E18 die Intensität der Antikörperfärbung für CXCR7 nur schwach ausgeprägt. Mit P3 nimmt die Intensität der Färbung deutlich zu und bleibt bis zum adulten Tier bestehen. Dies zeigt einen Anstieg der Expression des CXCR7 im Laufe der Entwicklung. Die Überlagerungsbilder bestätigen eine Lokalisation des Rezeptors innerhalb der Muskelfasern (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2: CXCR7- Expression *in vivo*.** Immunhistochemischer Nachweis von CXCR7 und MyHC an Muskelschnitten aus dem Oberschenkel bzw. des M.quadriceps femoris von Mäusen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Der CXCR7 (rot) wird bei E18 nur sehr gering exprimiert. Im Gegensatz zum CXCR4 steigt mit zunehmenden Alter die Expression des CXCR7 an und ist bis zum adulten Tier deutlich in der Muskulatur (gelb-orange) erkennbar. Der Rezeptor ist innerhalb der Muskelfaser (grün) lokalisiert. Maßstab: 100 µm.

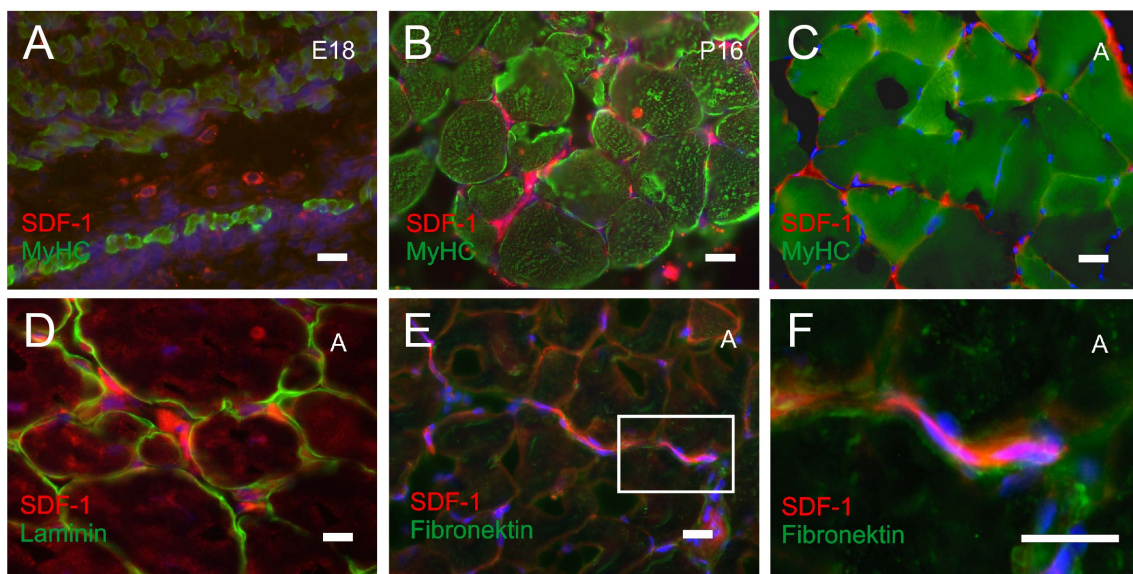
## SDF-1 $\alpha$

Nachfolgend stellte sich die Frage, ob der Ligand beider Rezeptoren ebenfalls in der Muskulatur zu finden ist. Hierfür wurden die Kryoschnitte (Oberschenkelmuskulatur der C57BL/6-Mäuse) der vorher beschriebenen Altersklassen erneut doppelmarkiert. In E18 sind SDF-1 $\alpha$  positive Bereiche im angrenzenden Bindegewebe an die Muskelanlagen lokalisiert (Abb. 4.3A). Es war ebenfalls zu erkennen, dass SDF-1 $\alpha$  nicht direkt in der



## 4. ERGEBNISSE

Muskulatur vorkam. Im weiteren Verlauf der Entwicklung veränderte sich das Expressionsmuster geringfügig. Bei P16 und dem adulten Tier fiel auf, dass SDF-1 $\alpha$  nun innerhalb des Muskels, in der direkten Umgebung der Muskelfaser zu finden war. Dies spricht für eine Lokalisation im Endomysium (Abb. 4.3B und C). Zur Bestätigung dieser Lokalisation im Endomysium erfolgte eine Doppelmarkierung der Schnitte mit Antikörpern gegen SDF-1 $\alpha$  und Laminin bzw. Fibronektin. Abbildung 4.3D zeigt deutlich das die Basallamina begrenzende Laminin (grün). SDF-1 $\alpha$  (rot) befindet sich jedoch zwischen zwei benachbarten Laminae. Die Anfärbung mit Antikörpern gegen SDF-1 $\alpha$  (rot) und Fibronektin (grün) zeigt eine Kolokalisation (gelb-orange) von SDF-1 $\alpha$  und fibronektin-positiven Fibroblasten (Abb. 4.3E und F).

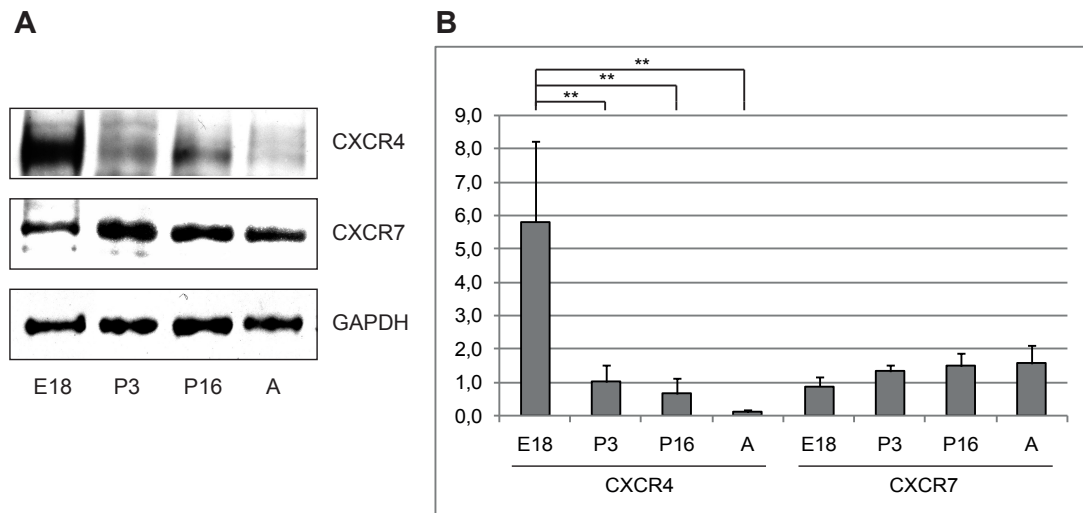


**Abbildung 4.3: Verteilung des SDF-1 $\alpha$  in der Muskulatur.** (A) Pränatal (E18) zeigt sich eine SDF-1 $\alpha$ -Lokalisation (rot) im angrenzenden Bindegewebe an die Muskulatur (grün). (B) Bei P16 stellt sich SDF-1 $\alpha$  in der direkten Umgebung der Muskelfaser dar und scheint mit dem Endomysium assoziiert zu sein. (C) Auch im adulten Tier (A) ist SDF-1 $\alpha$  in endomysialen Strukturen um die Muskelfaser herum lokalisiert. (D) Die Doppelmarkierung der Schnitte mit Antikörpern gegen SDF-1 $\alpha$  und Laminin bestätigen die Lokalisation von SDF-1 $\alpha$  im Endomysium. (E, F) Die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen SDF-1 $\alpha$  und Fibronektin zeigt die Lokalisation des Chemokins in fibronektin-positiven Fibroblasten (gelb-orange). (F) Vergrößerung eines Bildausschnittes der Abbildung E. Dapi (blau) = Zellkerne, A-C Maßstab: 50  $\mu$ m, D-F 25  $\mu$ m.

### 4.1.2 Westernblot

Die Quantifizierung der Ergebnisse aus der Immunhistochemie erfolgte mit Hilfe des Westernblots. Hierbei zeigte sich eine hohe Expression des CXCR4 im embryonalen Ent-

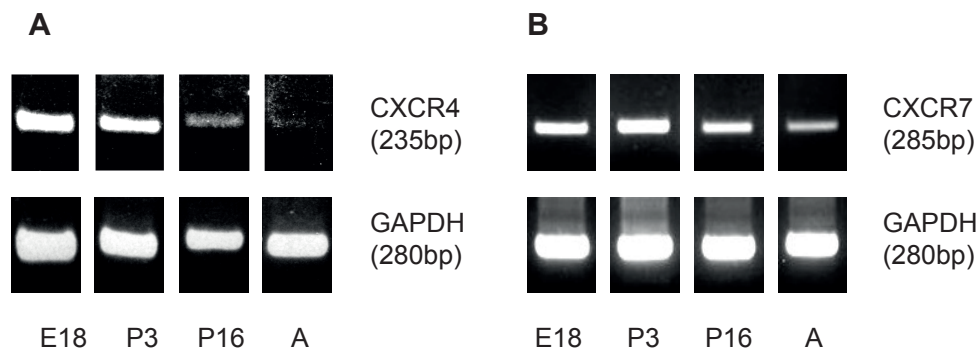
wicklungsstadium der Muskulatur (Abb. 4.4A). Im Gegensatz dazu war die Proteinmenge des CXCR7 deutlich niedriger (Abb. 4.4A). In der pränatalen Entwicklung (P3) nahm die Menge an detektierbarem Protein für CXCR4 um 82 % ab und blieb bis zum Erwachsenenalter auf einem niedrigen Niveau (Abb. 4.4B). Umgekehrt stieg die Proteinmenge des CXCR7 in der pränatalen Entwicklung der Muskulatur um mehr als 50 % an und blieb bis zum Erwachsenenstadium fast unverändert auf diesem Niveau bestehen (Abb. 4.4B). Diese Quantifizierung bestätigte einen reziproken Verlauf der Expression beider Rezeptoren während der Entwicklung der Gliedmaßenmuskulatur.



**Abbildung 4.4: CXCR4- und CXCR7- Expression *in vivo*.** (A) Der Westernblot von Muskelhomogenaten aus dem Oberschenkel bzw. des M. quadriceps femoris von Mäusen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigte eine abnehmende Expression des CXCR4 und eine zunehmende Expression des CXCR7. (B) Die quantitative Analyse belegte einen statistisch signifikanten Abfall des CXCR4 um das Sechsfache zwischen E18 und A. Der CXCR7 hingegen stieg von E18 bis A um das Doppelte an,  $n=3-4$ ,  $*p<0,05$ .

### 4.1.3 PCR

Zuletzt wurde eine PCR durchgeführt. Abb. 4.5A zeigt das PCR-Ergebnis des CXCR4 im Verlauf der Entwicklung der Muskulatur. Bei E18 war eine hohe Anzahl an Transkripten erkennbar. Diese nahm bis zum adulten Tier fast vollständig ab und war kaum noch detektierbar. Als Nachweis einer gelungenen PCR diente GAPDH. Dies zeigte bei allen Ansätzen eine konstante Menge an Endprodukten. CXCR7 hingegen zeigte über alle Altersstufen hinweg eine gleichmäßige Menge von Transkripten. GAPDH diente ebenso als Positivkontrolle (Abb. 4.5B).



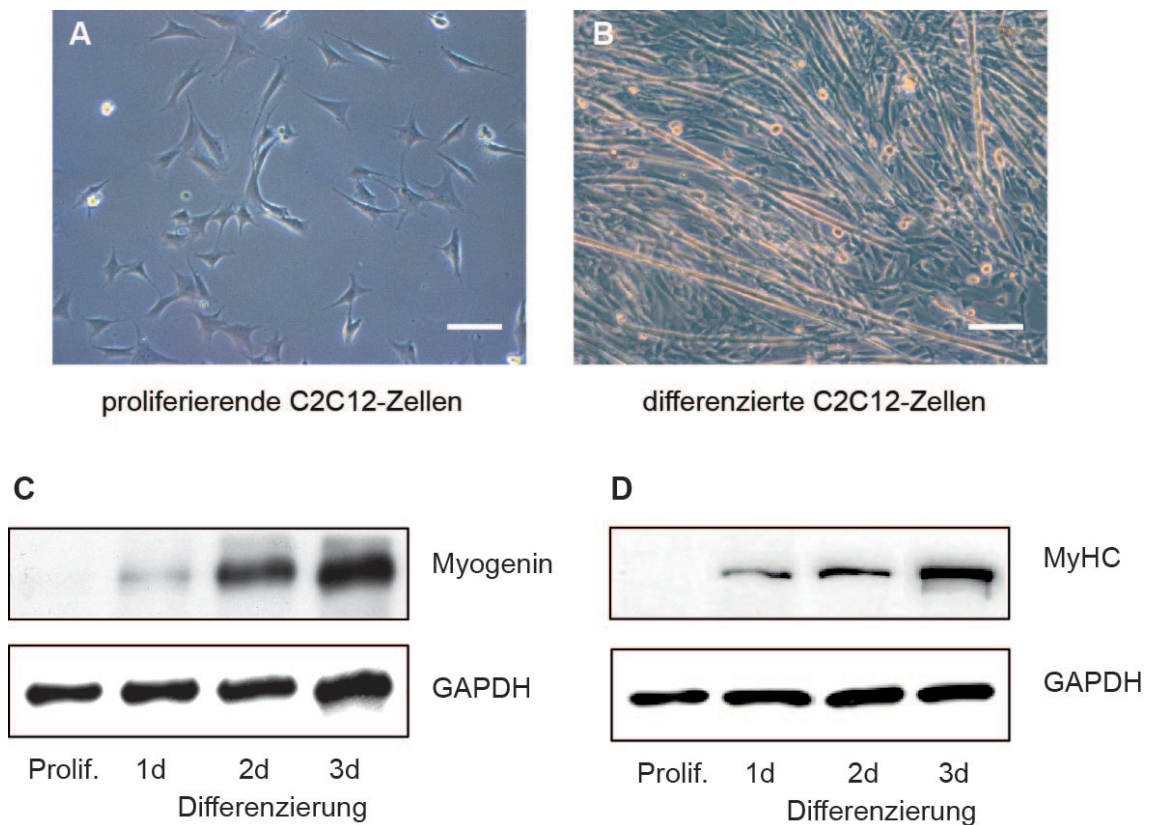
**Abbildung 4.5: PCR zu CXCR4 und CXCR7** aus genomischer DNA. CXCR4 zeigte eine Abnahme der PCR-Produkte im Laufe der Entwicklung. Die PCR-Produkte des CXCR7 hingegen blieben konstant.

## 4.2 C2C12-Zellen als Modellsystem für Proliferation und Differenzierung

### 4.2.1 Kontrolle der C2C12-Zellaktivität

C2C12-Zellen stellen ein häufig verwendetes Modellsystem zur Untersuchung der Muskel-differenzierung *in vitro* dar. Hierbei wird die Eigenschaft ausgenutzt, diese Zellen durch Reduktion des Serumanteils im Medium zu differenzieren. Um das beschriebene Verhalten der Zellen zu reproduzieren erfolgte zunächst die Proliferation in Kultivierungsmedium mit 10% FCS (Abb. 4.6A). Nach 48 h war ein konfluenter Rasen auf dem Boden der Zellkulturplatte sichtbar. Durch Reduktion des Serums auf 1% im Kultivierungsmedium wurde der Differenzierungsprozess eingeleitet. Nach 24 h ließen sich erste spindelförmige Erweiterungen der Zellen erkennen. Nach 72 h bestand der überwiegende Anteil der Kultur aus langgestreckten, mehrkernigen Myotuben (Abb. 4.6B), welche Vorläufer der funktionellen Muskelfasern darstellen. Der Verlauf dieses Differenzierungsprozesses ähnelt der *in vivo* beobachteten embryonalen Muskelentwicklung.

Zur weiteren Charakterisierung der vorliegenden Zelllinie wurde die Expression von Myogenin und MyHC untersucht. Myogenin fördert die Differenzierung der Myoblasten zu multinukleären Myotuben. MyHC hingegen ist ein Marker für differenzierte Myoblasten. Die Analyse erfolgte im Westernblot. C2C12-Zellen zeigten unter Proliferationsbedingungen keine Expression von Myogenin und MyHC. Im Verlauf des Differenzierungsprozesses nahmen beide Proteine zu. So ließen sich nach drei Tagen Differenzierung die größten Proteinmengen von Myogenin und MyHC nachweisen (Abb. 4.6C und D).



**Abbildung 4.6: Verhalten von C2C12-Zellen nach Serumdeprivation** (A) Proliferierende und (B) für drei Tage differenzierte C2C12-Zellen in einer Nativaufnahme, Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (C+D) Die Expression von Myogenin und MyHC war unter proliferativen Bedingungen nicht detektierbar. Die Proteine waren am ersten Tag der Differenzierung erstmalig nachweisbar und stiegen mit fortschreitender Differenzierung weiter an. GAPDH diente als Ladekontrolle.

### 4.2.2 Expressionsanalyse von CXCR4 und CXCR7 in proliferierenden und differenzierten C2C12-Zellen

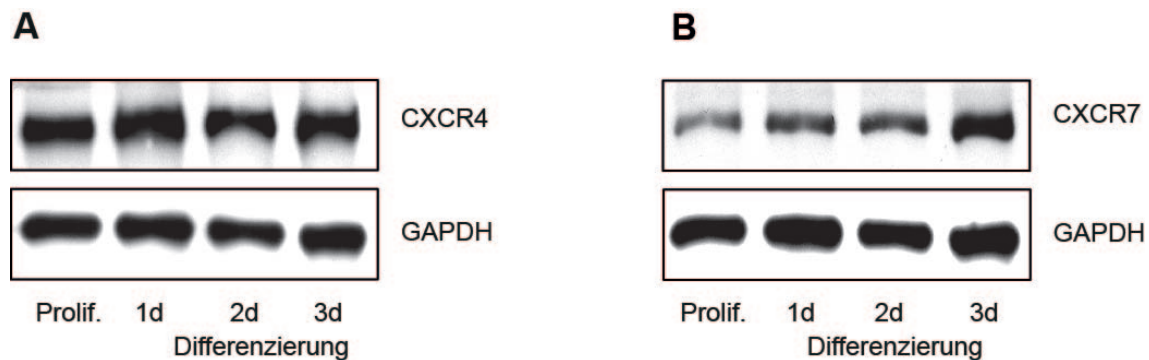
#### Westernblot

Ausgehend von ÖDEMIS et al. (2007), welche die Expression des CXCR4 in C2C12-Zellen zeigten, sollte in diesem Teil der Arbeit der Verlauf der Expression des CXCR4, und ergänzend des CXCR7, in C2C12-Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen wurden unter Proliferationsbedingungen und am ersten, zweiten und dritten Tag der Differenzierung geerntet. Der Westernblot zeigte eine hohe Expression des CXCR4 in C2C12-Zellen unter proliferativen Bedingungen, wohingegen CXCR7 deutlich weniger exprimiert wurde (Abb. 4.7A). Nach der Umstellung auf Differenzierungsbedingungen blieb die Expression des CXCR4 annähernd konstant, während die Menge an exprimierten CXCR7 kontinuierlich anstieg (Abb. 4.7A). Nach der quantitativen Analyse betrug die Zunahme des CXCR7 das

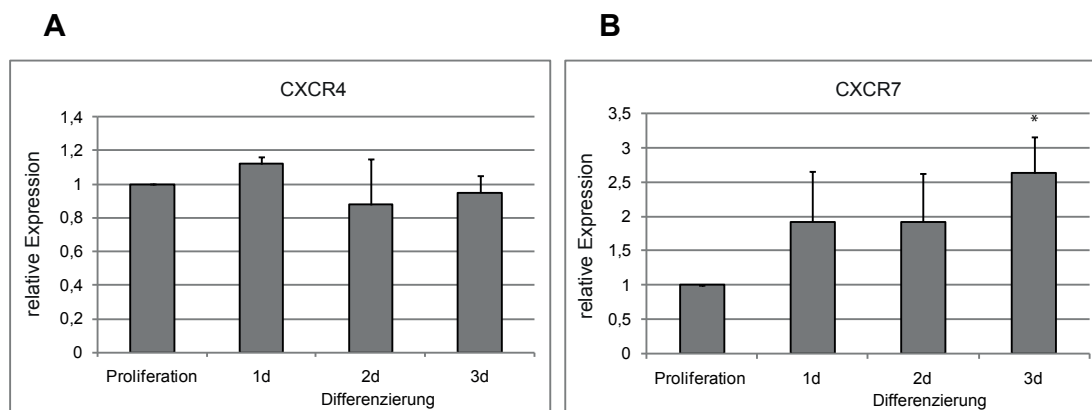


## 4. ERGEBNISSE

2,5-fache zur detektierten Proteinmenge unter Proliferationsbedingungen und war somit statistisch signifikant (Abb. 4.8B).



**Abbildung 4.7: Expression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen.** (A) Western-blot Analyse der CXCR4-Expression. Während der gesamten Zeitdauer war keine Veränderung der Expression zu erkennen. (B) Der Westernblot des CXCR7 zeigte eine geringe Proteinmenge unter proliferativen Bedingungen, welche bis zum dritten Tag der Differenzierung deutlich anstieg.



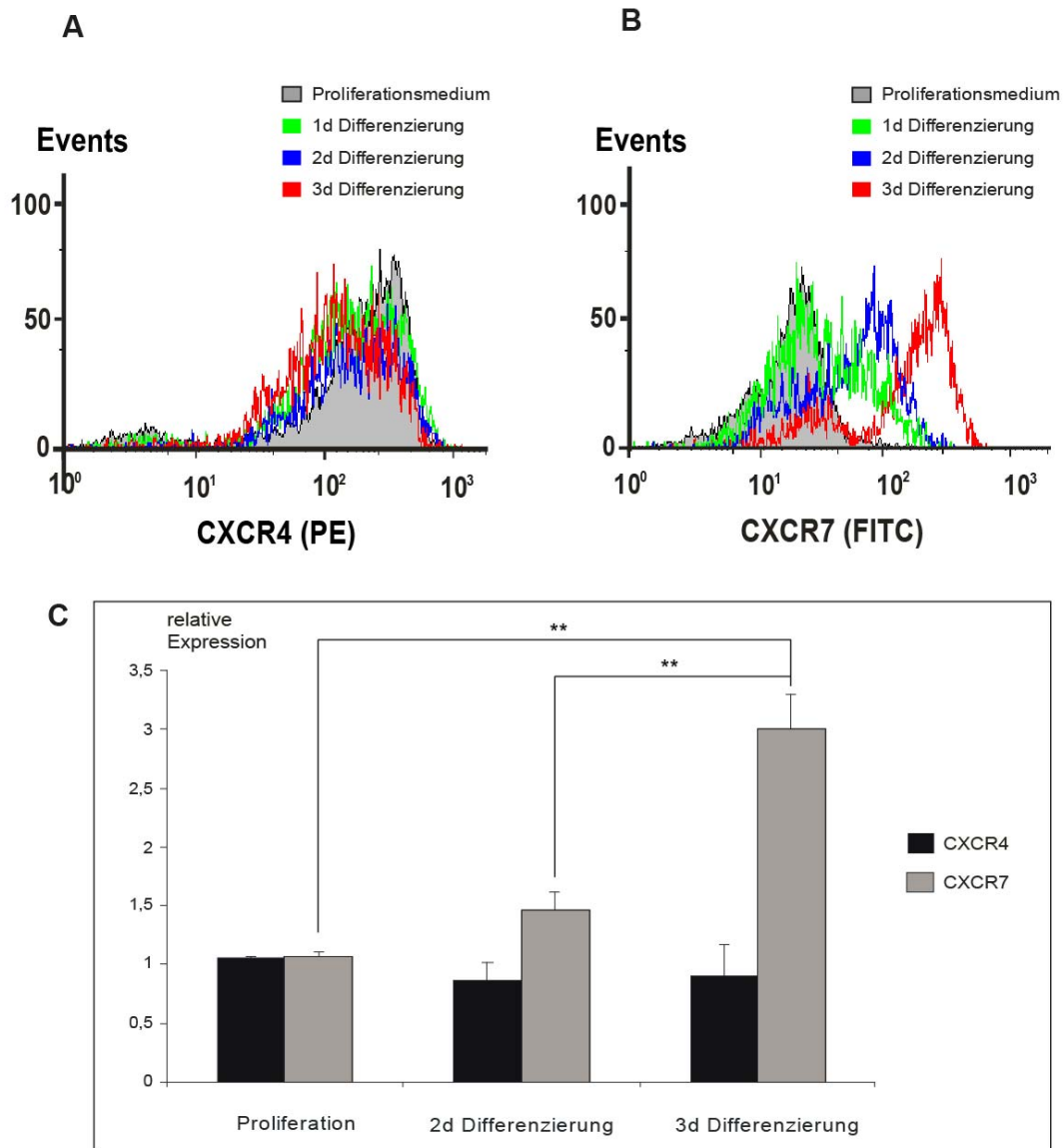
**Abbildung 4.8: Quantitative Analyse der Expression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen, n=4, \*p<0,05.** (A) Statistische Analyse der CXCR4-Expression, in der keine signifikanten Unterschiede des Proteingehalts erkennbar waren. (B) Der CXCR7 zeigte einen signifikanten Anstieg am dritten Tag der Differenzierung um das 2,5fache im Vergleich zum Proliferationszustand.

## FACS

Die FACS-Analyse fluoreszenzmarkierter C2C12-Zellen bestätigte die bisher gewonnenen Ergebnisse. So blieb die Menge des exprimierten CXCR4 mit fortschreitender Differenzierung konstant (Abb. 4.9A), was die kaum veränderten Fluoreszenzintensitäten zeigten (Abb. 4.9C). Im Gegensatz dazu zeigten die Intensitätsverteilungen des CXCR7 im Hi-

## 4.2 C2C12-Zellen als Modellsystem für Proliferation und Differenzierung

stogramm der unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkte einen deutlichen Rechts-Shift (Abb. 4.9B). Diese etwa dreifach erhöhte Intensität war proportional zu der vermehrt vorhandenen Anzahl an Bindungsstellen für den Rezeptor und wies auf eine erhöhte Expression hin (Abb. 4.9C).



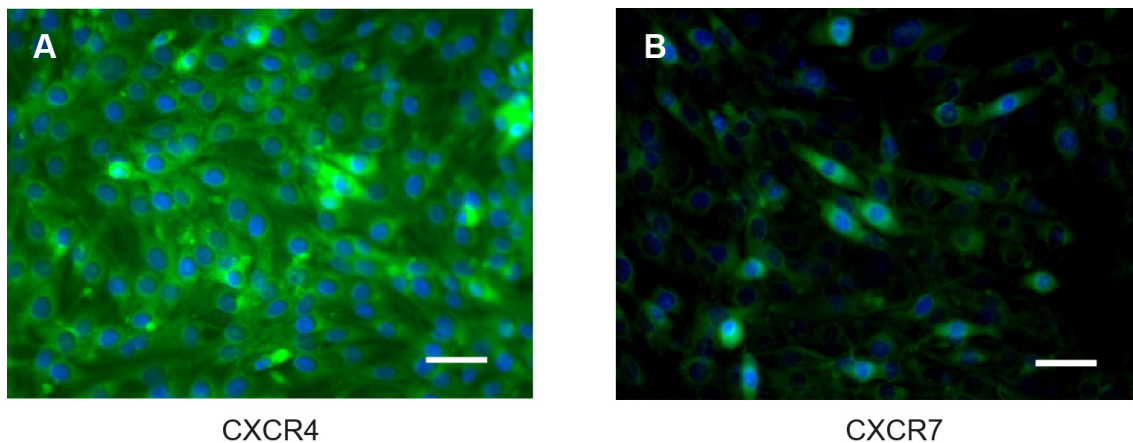
**Abbildung 4.9: FACS-Analyse von CXCR4 und CXCR7 im Differenzierungsverlauf.** (A) Die Analyse der CXCR4-Expression zeigte kaum Intensitätsverschiebungen über die untersuchte Zeitspanne hin. (B) Die Analyse des CXCR7 zeigte eine Intensitätsverschiebung des Rezeptors nach rechts und somit eine deutliche Zunahme der Expression. (C) Die statistische Auswertung belegt eine gleichförmige Expression des CXCR4 und einen signifikanten Anstieg des CXCR7 am dritten Tag der Differenzierung,  $n=4$ ,  $**p<0,01$ .

## 4. ERGEBNISSE

---

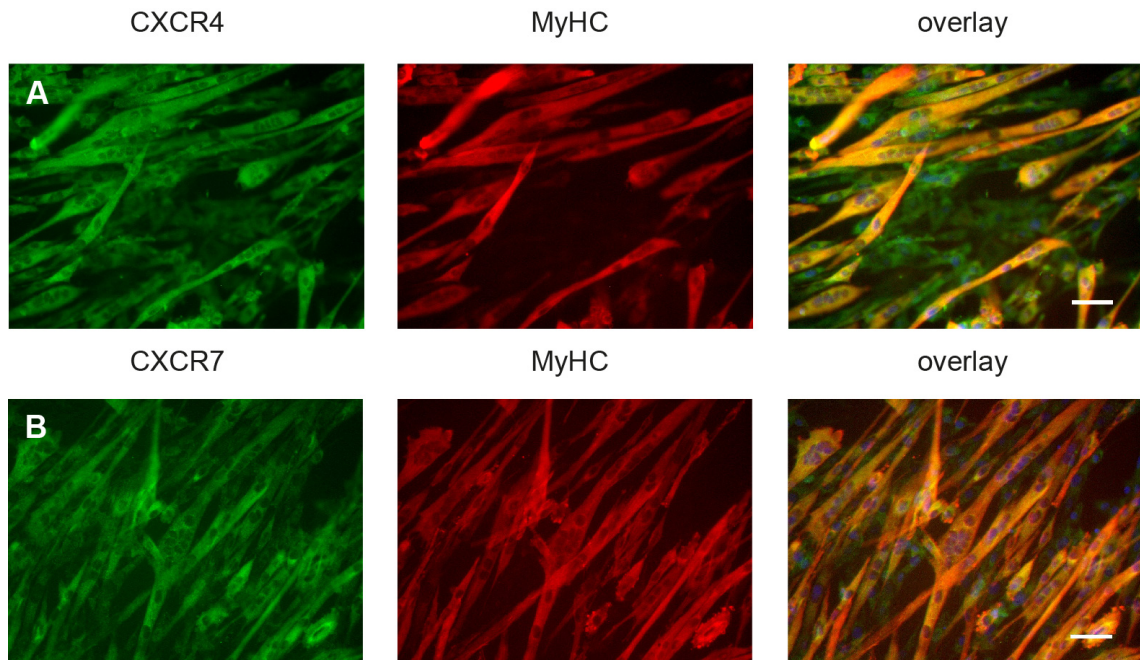
### Immunhistochemischer Nachweis von CXCR4 und CXCR7

Nachdem eine gleichbleibende Expressierung des CXCR4 und eine ansteigende Expressierung des CXCR7 während der Differenzierung gezeigt werden konnte, wurde die Rezeptorverteilung mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Fast alle Myoblasten zeigten unter Proliferationsbedingungen eine Immunreaktivität für CXCR4 (Abb. 4.10A). Im Vergleich dazu beschränkte sich die Expression des CXCR7 auf wenige Zellen, was sich in einer geringeren Anzahl angefärbter Zellen zeigte (Abb. 4.10B).



**Abbildung 4.10: Immunzytochemische Färbung von CXCR4 und CXCR7 unter Proliferationsbedingungen.** (A) Der grün dargestellte CXCR4 (Alexa488) zeigte eine gleichmäßige Verteilung in allen C2C12-Zellen. (B) CXCR7 (Alexa488) ist nur in einzelnen Zellen unter Proliferationsbedingungen nachweisbar. DAPI (blau) = Zellkerne, Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .

Nach drei Tagen Differenzierung erfolgte eine Doppelmarkierung. Die Zellen wurden parallel mit MF20 (Antikörper gegen MyHC) und dem jeweiligen Antikörper gegen den entsprechenden Rezeptor inkubiert. Abbildung 4.11A zeigt die Expression des CXCR4, welcher in fast allen Zellen anfärbbar ist. Ausdifferenzierte C2C12-Zellen sind auf Grund ihrer Morphologie (Myotuben) erkennbar. In der Überlagerung beider Bilder zeigte sich einerseits eine Kolokalisation des CXCR4 in differenzierten Zellen, andererseits sind CXCR4 positive Zellen zu erkennen, welche nicht differenziert sind, da keine immunpositive Antwort auf MyHC nachzuweisen war. In der Abbildung 4.11B erfolgte die immunhistochemische Anfärbung des CXCR7, MyHc ist ebenfalls markiert. Hierbei ist, im Gegensatz zum proliferativen Zustand, eine deutlich gesteigerte Expression des CXCR7 erkennbar. Die Überlagerung beider Anfärbungen zeigt, dass CXCR7 in MyHC-positiven Zellen lokalisiert ist und somit verstärkt in differenzierten Zellen vorzufinden ist.

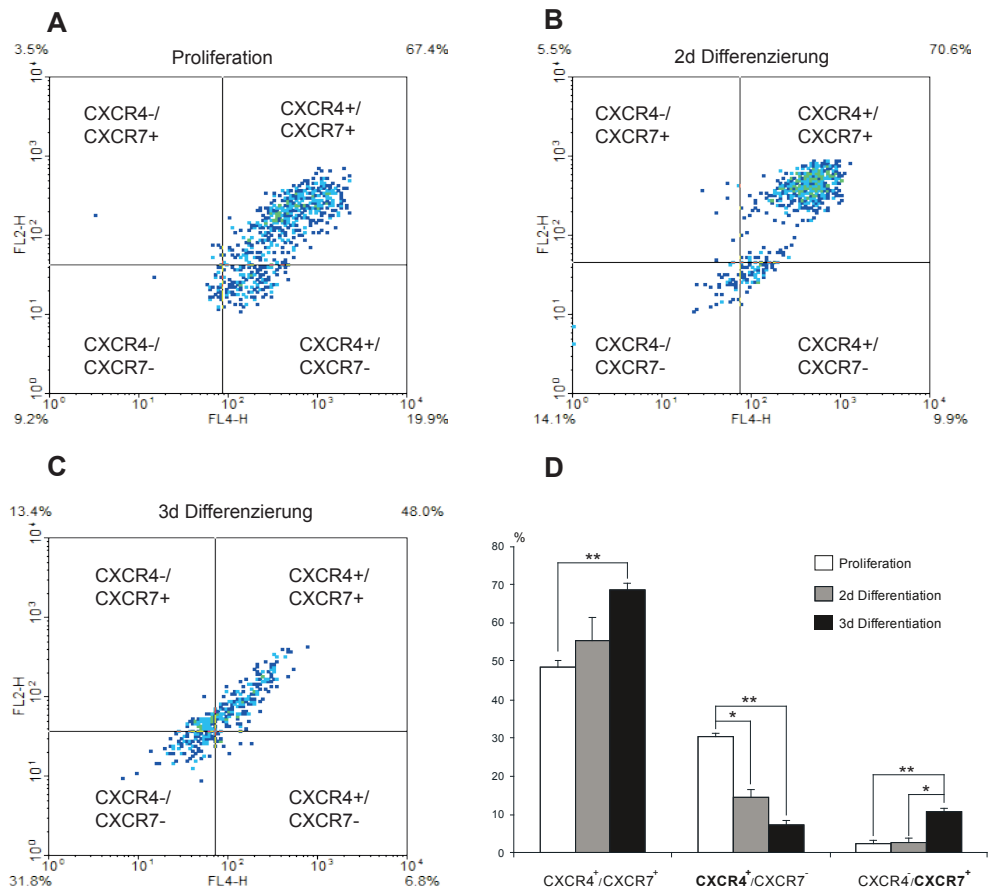


**Abbildung 4.11: Immunzytochemische Doppelmarkierung von C2C12-Zellen unter Differenzierungsbedingungen.** Im Bild ist eine Doppelmarkierung der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 (je Alexa 488) und des MyHC (Cy3) zu sehen. Kolokalisationen sind gelb-orange gefärbt. Der CXCR4 (A) zeigte eine gleichmäßige Verteilung in proliferierenden (grün) und differenzierten (orange) Zellen. Die Expression des CXCR7 (B) ist hauptsächlich auf differenzierte Zellen (orange) begrenzt. DAPI (blau) = Zellkerne, Maßstab: 50 µm.

### 4.2.3 Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 und CXCR7 mit Hilfe der FACS

Im nächsten Schritt sollte die Oberflächenexpression beider Rezeptoren in der Proliferation und Differenzierung bestimmt werden. Abbildung 4.12A-C zeigt eine Punktdarstellung der Doppelmarkierung von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen unter proliferativen und Differenzierungsbedingungen. In den unterschiedlichen Quadranten lassen sich die Zellen ablesen, welche für CXCR4, CXCR7 oder beide Rezeptoren eine positive Färbung zeigten. Unter Proliferationsbedingungen bestand der größte Anteil der Population aus CXCR4+/CXCR7+ Zellen (Abb. 4.12A). In der quantitativen Analyse beträgt dieser Anteil ca. 50% (Abb. 4.12D). Im Verlauf der Differenzierung (Abb. 4.12B und C) stieg dieser Anteil statistisch signifikant auf ca. 70 %. Zusätzlich bestand die Kultur aus kleinen Anteilen von Zellen, welche nur einen der beiden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aufwiesen. Nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen ging der Anteil der CXCR4+ Fraktion signifikant auf 7% von anfänglich ca. 30% zurück. Umgekehrt zeigte sich die Entwicklung der CXCR7+ Zellen. Betrug die anfängliche Fraktion nur etwa 5%, so steigerte sich diese statistisch signifikant im Verlauf der Differenzierung auf etwa 11% (Abb. 4.12D).

## 4. ERGEBNISSE



**Abbildung 4.12: Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen mit Hilfe der FACS.** (A-C) Doppelmarkierung der Rezeptoren und deren Punktdarstellung in proliferativem und differenziertem Zustand. In Bild A (Proliferationsbedingungen) zeigt sich, dass die größte Population CXCR4<sup>+</sup>/CXCR7<sup>+</sup> Zellen sind. Mit zunehmender Differenzierung stieg der Anteil CXCR4<sup>+</sup>/CXCR7<sup>+</sup> Zellen an (C). Die Fraktion der CXCR4<sup>+</sup> nahm im Laufe der Differenzierung ab, während die Zahl der CXCR7<sup>+</sup> anstieg. (D) Quantitative Zusammenfassung von A-C, statistisch signifikanter Anstieg der CXCR4<sup>+</sup>/CXCR7<sup>+</sup> Zellen am dritten Tag der Differenzierung auf 69%. Die Fraktion der CXCR4<sup>+</sup>/CXCR7<sup>-</sup> Zellen sank unter Differenzierungsbedingungen auf 7%, während die CXCR4<sup>-</sup>/CXCR7<sup>+</sup> Zellen statistisch signifikant auf etwa 11% anstiegen, n=4, \*p<0,05, \*\*p<0,01.

### 4.2.4 Immunpräzipitation

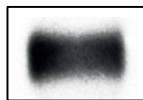
Auf Grund der Erkenntnis, dass die Mehrzahl der Zellen CXCR4<sup>+</sup> und CXCR7<sup>+</sup> sind, stellte sich die Frage, ob beide Rezeptoren Heterodimere bilden. Hierfür eignete sich die Methode der Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP). In dieser Arbeit erfolgte die Präzipitation einmal gegen CXCR4 und umgekehrt gegen CXCR7. Danach erfolgte die Inkubation der Westernblot-Membran mit dem jeweils anderen Antikörper. Abb. 4.13 zeigt das Ergebnis.

Bei der Ko-IP gegen den CXCR4 ließ sich eine spezifische Bande im Westernblot mit dem CXCR7-Antikörper detektieren. Ebenso erfolgte eine positive Reaktion, als die Membran mit den CXCR7 Ko-IP-Proben mit einem CXCR4-Antikörper behandelt wurde. Dieses Ergebnis gibt Hinweise auf eine Heterodimerbildung beider Rezeptoren, lässt jedoch keine Aussage über funktionelle Aspekte zu.

IP: CXCR4  
WB: CXCR7



IP: CXCR7  
WB: CXCR4



#### Abbildung 4.13: Immunpräzipitation.

Wurde gegen den CXCR4 präzipitiert, zeigte sich im Westernblot eine positive CXCR7-Bande. Umgekehrt war das Ergebnis für CXCR4 positiv, wenn gegen den CXCR7 präzipitiert wurde. IP = Immunpräzipitation, WB = Westernblot.

## 4.3 Funktion von CXCR4 und CXCR7

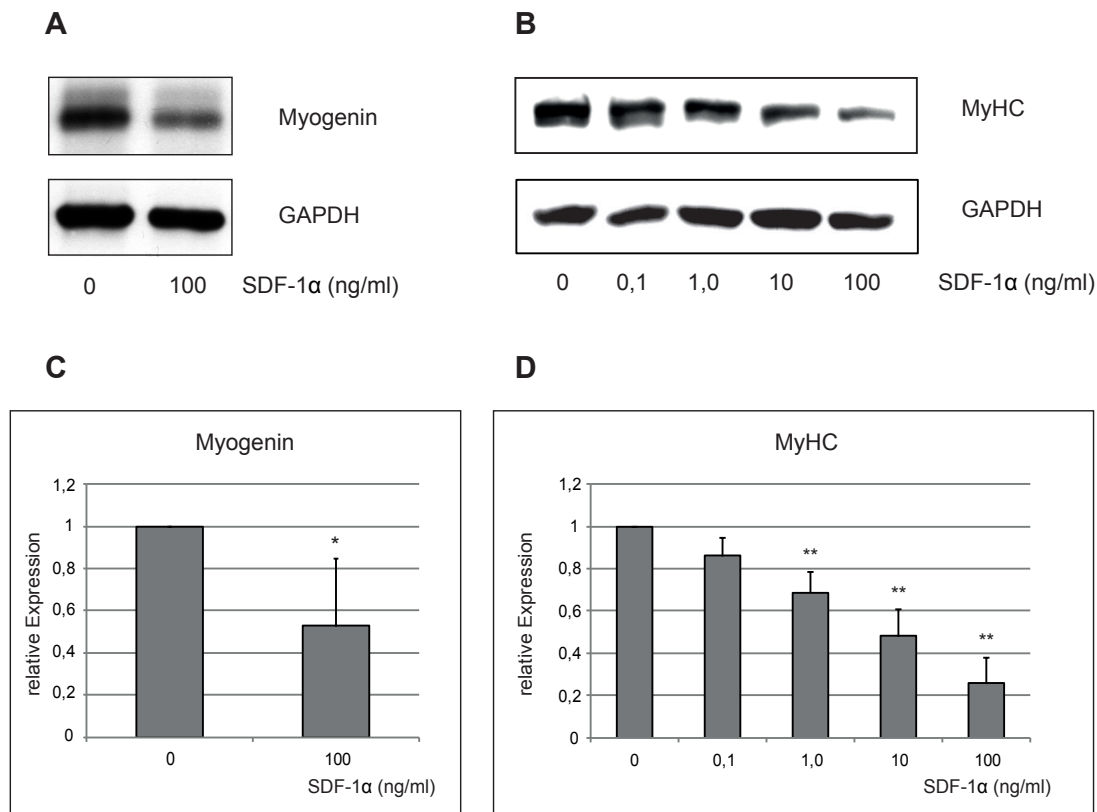
### 4.3.1 Hemmender Einfluß von SDF-1 $\alpha$ auf C2C12-Zellen

#### Westernblot

Da die Funktionsweise des SDF-1 $\alpha$  bei der Differenzierung von C2C12-Zellen in den letzten Jahren kontrovers diskutiert wurde (ÖDEMIS et al. 2007, MELCHIONNA et al. 2010) erfolgte eine nochmalige Überprüfung dieses Einflusses auf die Differenzierung von C2C12-Zellen. In dieser Arbeit konnte der von ÖDEMIS et al. (2007) gezeigte, hemmende Effekt des SDF-1 $\alpha$  auf die Differenzierung bestätigt werden. Bei der Behandlung der C2C12-Zellen mit 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  (Abb. 4.14A) über drei Tage, zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung (Abb. 4.14C) des Myogenin um knapp 50%. Zusätzlich erfolgte eine Hemmung der MyHC-Expression. Die Kontrollprobe zeigte eine hohe MyHC-Expression (Abb. 4.14B), während bereits bei einer Konzentration von 1,0 ng/ml eine statistisch signifikante Hemmung der MyHC-Expression um ca. 30% eintrat (Abb. 4.14D). Dieser Effekt verstärkt sich konzentrationsabhängig. Beim Einsatz von 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ , kam es zu einer Reduzierung der MyHC-Expression um ca. 70% (Abb. 4.14D).



## 4. ERGEBNISSE

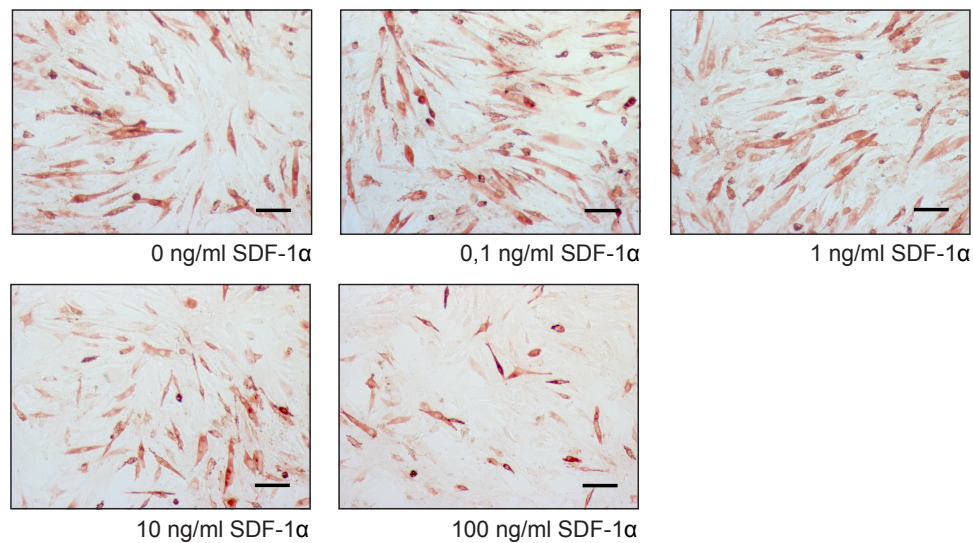


**Abbildung 4.14: Einfluss von SDF-1α auf die Myogenin- und MyHC-Expression.**

Die Kultivierung von SDF-1α-stimulierten C2C12-Zellen unter Differenzierungsbedingungen zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Expression von Myogenin (A) und MyHC (B). Die quantitative Analyse ergab bei einer SDF-1α-Konzentration von 100 ng/ml eine 50%ige (n=4, \*p<0,05) Expressionshemmung von Myogenin (C) und eine Reduzierung der MyHC-Expression um ca. 70% (n=7, \*\*p<0,01).

### Immunhistochemie

Zur Bestätigung der im Westernblot erlangten Ergebnisse, erfolgte der immunhistochemische Nachweis von MyHC bei SDF-1α behandelten Zellen, welche drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden. MyHC diente als Marker für die Differenzierung. In der Kontrollprobe (0 ng/ml SDF-1α) waren deutlich mehrkernige Myotuben zu erkennen. Während bei SDF-1α-Konzentrationen von 0,1 ng/ml und 1,0 ng/ml kaum eine Reduzierung zu erkennen war, zeigen sich bei 10 ng/ml SDF-1α bereits weniger mehrkernige Myotuben. Wie im Westernblot, war der Effekt bei 100 ng/ml SDF-1α am deutlichsten. Es lagen kaum MyHC-positive Zellen vor und nur eine sehr geringe Zahl an Myotuben, was insgesamt den hemmenden Einfluß von SDF-1α auf die myogene Differenzierung bestätigt (Abb. 4.15).



**Abbildung 4.15: Immunzytochemischer Nachweis des Einflusses von SDF-1 $\alpha$  auf die MyHC-Expression.** DAB-Färbung von drei Tage differenzierten C2C12-Zellen. Die unstimulierte Kontrolle zeigt eine normale MyHC-Expression in langgestreckten Myotuben. Mit der Zunahme der SDF-1 $\alpha$ -Konzentration nahm der Anteil mehrkerniger Myotuben um mehr als 60% ab. Maßstab: 100  $\mu$ m.

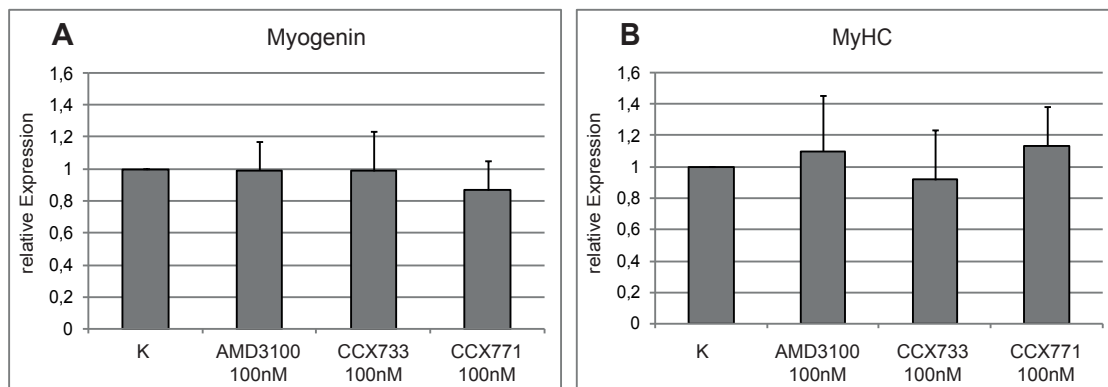
#### 4.3.2 Die Wirkung von Blockern auf die Differenzierung

Bisher wurde angenommen, dass der Faktor SDF-1 $\alpha$  eine selektive Wirkung über den CXCR4 erzielt. Exprimiert ein Gewebe jedoch beide Rezeptoren, welche SDF-1 $\alpha$  als Ligand besitzen, stellt sich die Frage, welche Funktion die beiden Rezeptoren übernehmen. Es gibt mehrere Varianten *in vitro* einen der beiden Rezeptoren funktionell auszuschalten. Eine Variante ist das Arbeiten mit Antagonisten. Wird ein Rezeptor ausgeschaltet lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des Anderen ziehen.

Für die Blockierung des CXCR4 wurde AMD3100 eingesetzt, CXCR7 wurde mit Hilfe von CCX733 oder CCX771 gehemmt. Um Nebeneffekte auszuschließen, wurde die Wirkung der Konzentration von 100 nM des jeweiligen Blockers auf die C2C12-Zellen ausgetestet. Die eingesetzte Menge ergab sich aus bereits früher verwendeten Konzentrationen innerhalb der Arbeitsgruppe. Zunächst wurden die Zellen drei Tage mit dem entsprechenden Blockern im Differenzierungsmedium behandelt. Anschließend wurde der Einfluss auf die Myogenin- und MyHC-Expression überprüft. Wie die quantitative Analyse zeigte, hatte eine Konzentration von 100 nM der jeweiligen Blocker keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der beiden Proteine (Abb. 4.16A und B).



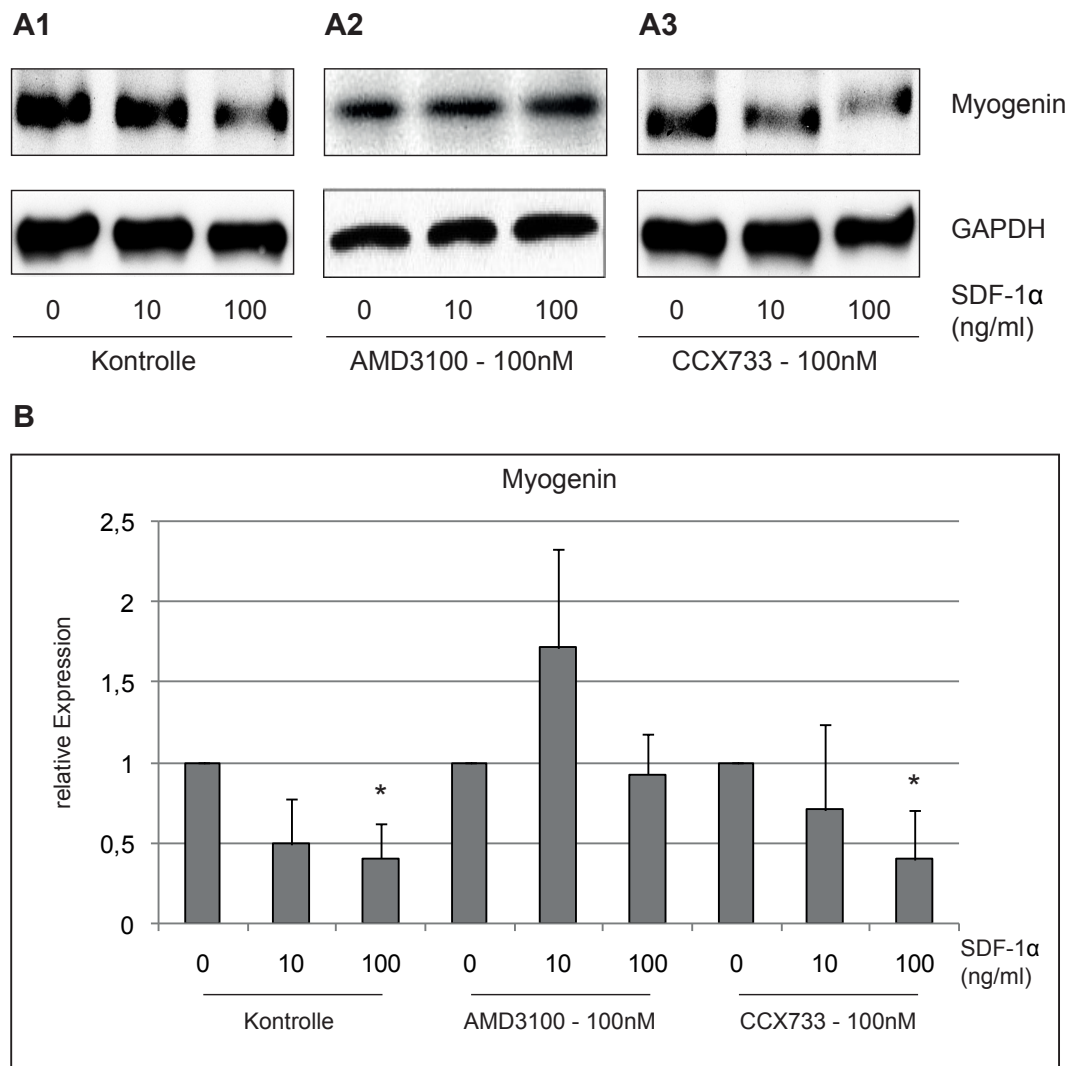
## 4. ERGEBNISSE



**Abbildung 4.16: Wirkung von AMD3100, CCX733 und CCX771 auf die Myogenin- und MyHC-Expression, n=4.** Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluss der getesteten Antagonisten auf die Myogenin-(A) oder die MyHC-(B) Expression.

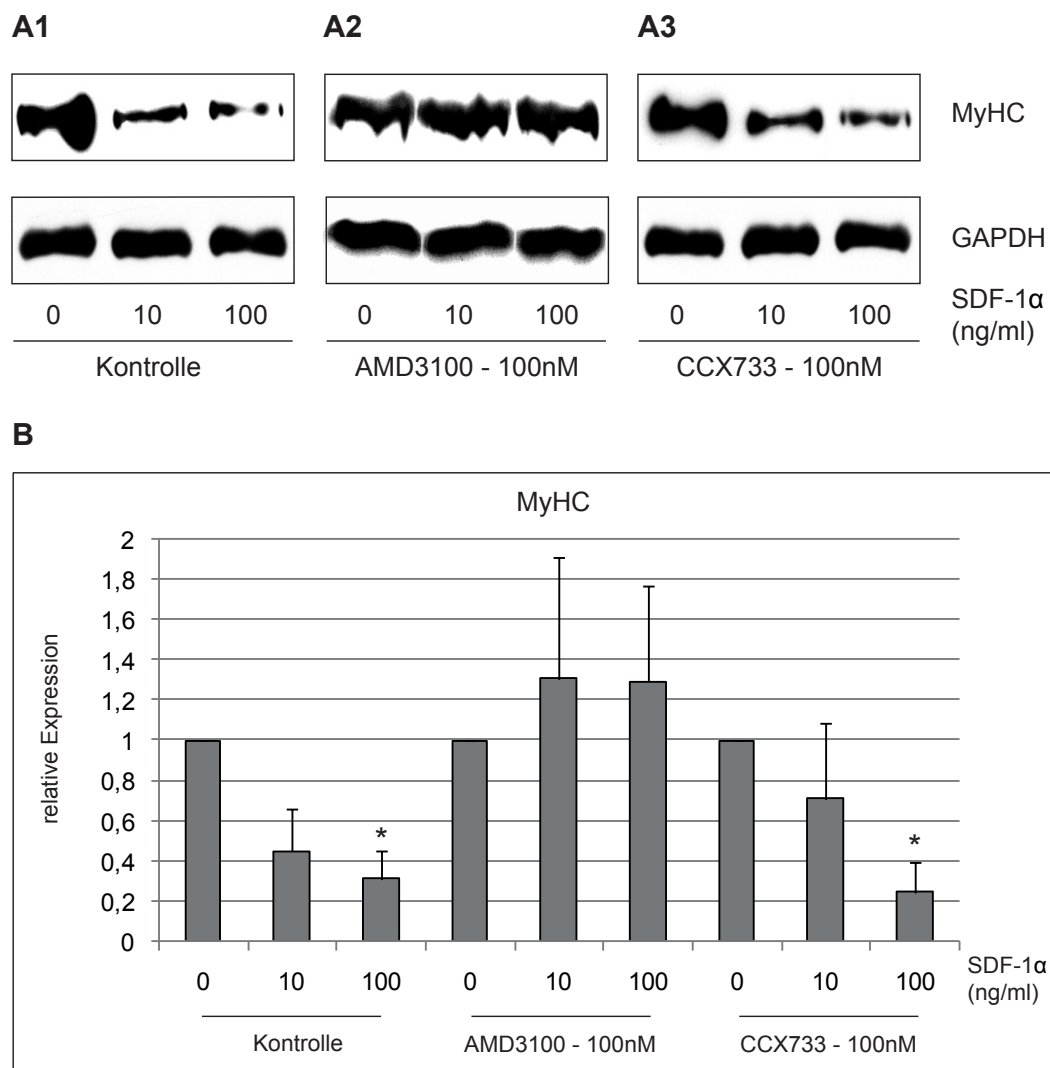
### SDF-1 $\alpha$ hemmt die Differenzierung über CXCR4

Im folgenden Versuch wurden die C2C12-Zellen drei Tage unter Differenzierungsbedingungen gehalten und mit einer Konzentration von 100 nM des entsprechenden Blockers AMD3100 oder CCX733 und mit 10 ng/ml und 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  behandelt. Es folgte eine dreitägige Differenzierungsphase. Anschließend wurde die Myogenin- und MyHC-Expression im Westernblot untersucht (Abb. 4.17A, Abb. 4.18A). Die Kontrollen zeigten eine Abnahme der Proteinmengen wie bereits beschrieben. Danach erfolgte eine Blockierung des CXCR4 mit AMD3100. Dies führte nach drei Tagen zu einer Aufhebung des Hemmeffektes von SDF-1 $\alpha$  auf Myogenin und MyHC (Abb. 4.17A2, Abb. 4.18A2). Geringgradige Anstiege in der Expression beider Proteine wiesen keine statistische Signifikanz auf (Abb. 4.17B, Abb. 4.18B). Die Antagonisierung von CXCR7 führte zu keinem Effekt. Die hemmende Wirkung von SDF-1 $\alpha$  blieb vollständig erhalten (Abb. 4.17A3, Abb. 4.18A3) und führte zu einer um 60% verringerten Myogenin- und einer um mehr als 70% reduzierten MyHC-Expression (Abb. 4.17B, Abb. 4.18B). Zusammenfassend zeigte sich, dass mit der Blockierung des CXCR4 die Hemmwirkung des SDF-1 $\alpha$  auf Myogenin und MyHC aufgehoben wird, während diese unter Blockierung des CXCR7 vollständig erhalten bleibt.



**Abbildung 4.17: Wirkung von CXCR4 und CXCR7 auf die Myogeninexpression und Quantitative Analyse.** (A1) Kontrolle, welche die Hemmung der Myogeninexpression unter SDF-1α-Stimulation zeigt. (A2) Aufhebung des inhibitorischen Effektes von SDF-1α durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100. (A3) Erhaltung des Hemmeffektes von SDF-1α auf die Myogeninexpression trotz Blockierung des CXCR7 mit Hilfe des Antagonisten CCX733. GAPDH diente zur Standardisierung. (B) Die Quantitative Analyse zeigt unter dem Antagonisten AMD3100 eine vollständige Aufhebung des Effektes von SDF-1α, während unter CCX733 die Hemmung der Myogeninexpression statistisch signifikant erhalten blieb, n=3-9, \*p<0,05.

## 4. ERGEBNISSE

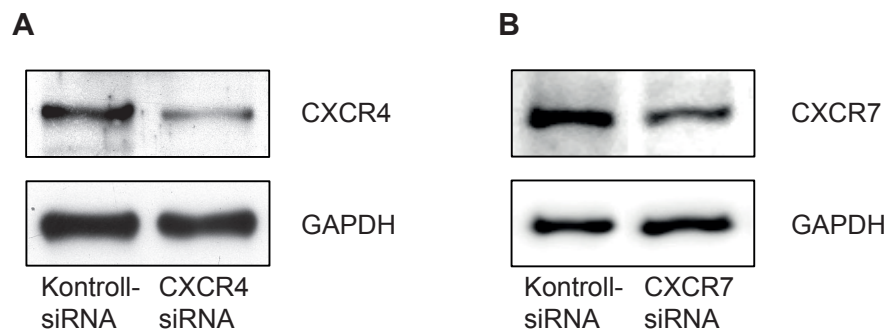


**Abbildung 4.18: Wirkung von CXCR4 und CXCR7 auf die MyHC-Expression und Quantitative Analyse.** (A1) Kontrolle, welche die Hemmung der MyHC-Expression unter SDF-1 $\alpha$ -Stimulation zeigt. (A2) Aufhebung des inhibitorischen Effekts von SDF-1 $\alpha$  durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100. (A3) Erhaltung des Hemmeffektes von SDF-1 $\alpha$  auf die MyHC-Expression trotz Blockierung des CXCR7 mit Hilfe des Antagonisten CCX733. GAPDH diente zur Standardisierung. (B) Die Quantitative Analyse zeigt unter dem Antagonisten AMD3100 eine vollständige Aufhebung des Hemmeffektes von SDF-1 $\alpha$  auf die MyHC-Expression, während dieser unter dem Antagonisten CCX733 statistisch signifikant erhalten blieb, n=3-9, \*p<0,05.

### 4.3.3 siRNA-Transfektion der C2C12-Zellen

Da die pharmakologischen Antagonisten in ihrer Wirkung weniger selektiv sein können, wurden die bisherigen Ergebnisse mit einer zweiten Methode, der siRNA-Transfektion, überprüft. Dazu wurde eine nhRNA (Kontroll-siRNA) als Kontrolle genutzt, um andere

Einflüsse (wie die der Transfektionsreagenz) auszuschließen. Abbildung 4.19A zeigt einen repräsentativen Westernblot für die Transfektion der Zellen mit einer CXCR4-spezifischen siRNA (50nM). In drei unabhängigen Experimenten ergab sich eine Hemmung der Rezeptorexpression von  $67 \pm 5\%$ . Die Expression des CXCR7 konnte ebenso erfolgreich mit einer spezifischen siRNA (40nM) herunterreguliert werden. Die Überprüfung erfolgte auch hier mit dem Westernblot (Abb. 4.19B) und ergab eine durchschnittliche Hemmung der CXCR7-Expression von  $67 \pm 12\%$  ( $n=5$ ). Somit konnte effizient der entsprechende Rezeptor herunterreguliert werden, um nachfolgende Versuche durchzuführen.

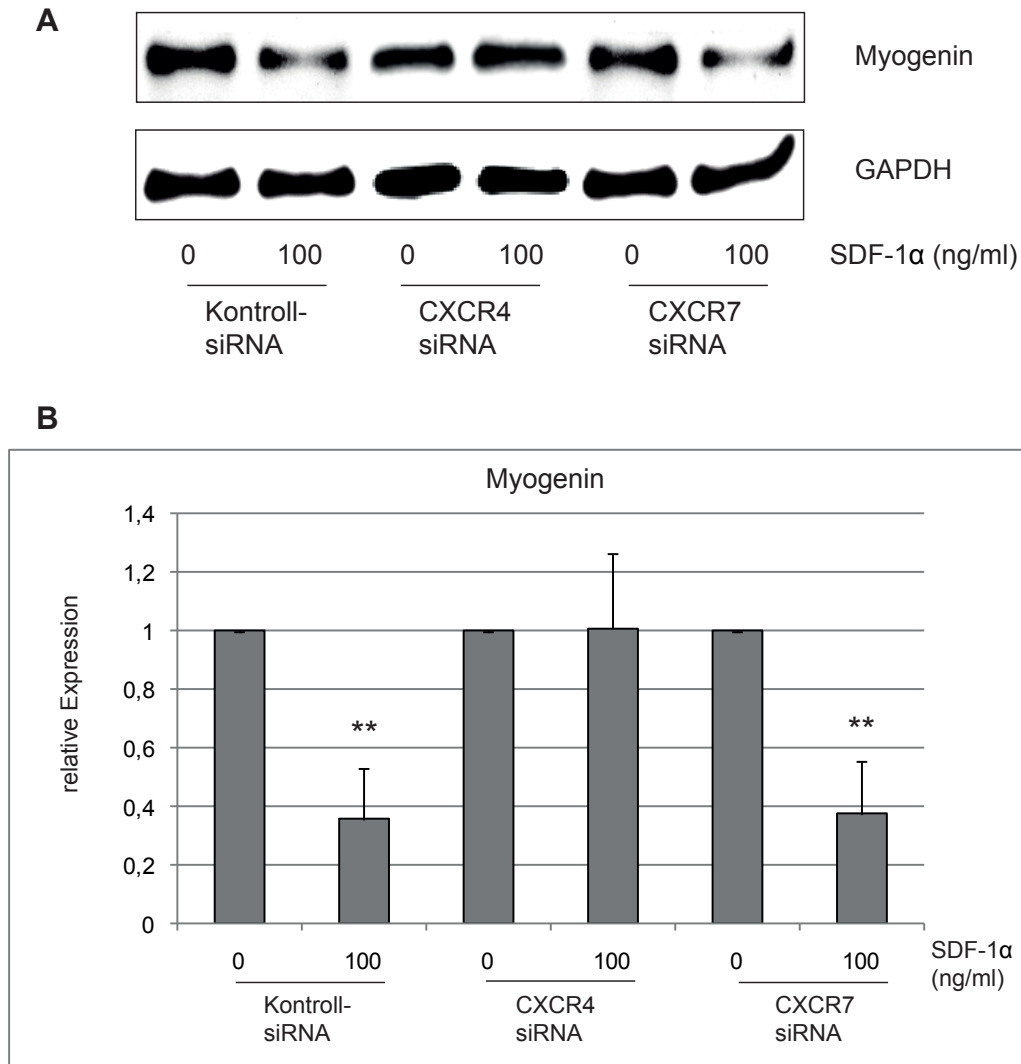


**Abbildung 4.19: Kontrolle der Hemmung der Rezeptorexpression durch spezifische siRNA.** (A) Westernblot einer Kontroll-siRNA und einer transfizierten Probe mit der siRNA (50nM) für CXCR4. Die Effizienz beträgt  $67 \pm 5\%$ ,  $n=3$ . (B) Westernblot einer Kontroll-siRNA und einer transfizierten Probe mit der siRNA (40nM) für CXCR7. Die Effizienz beträgt  $67 \pm 12\%$ ,  $n=5$ .

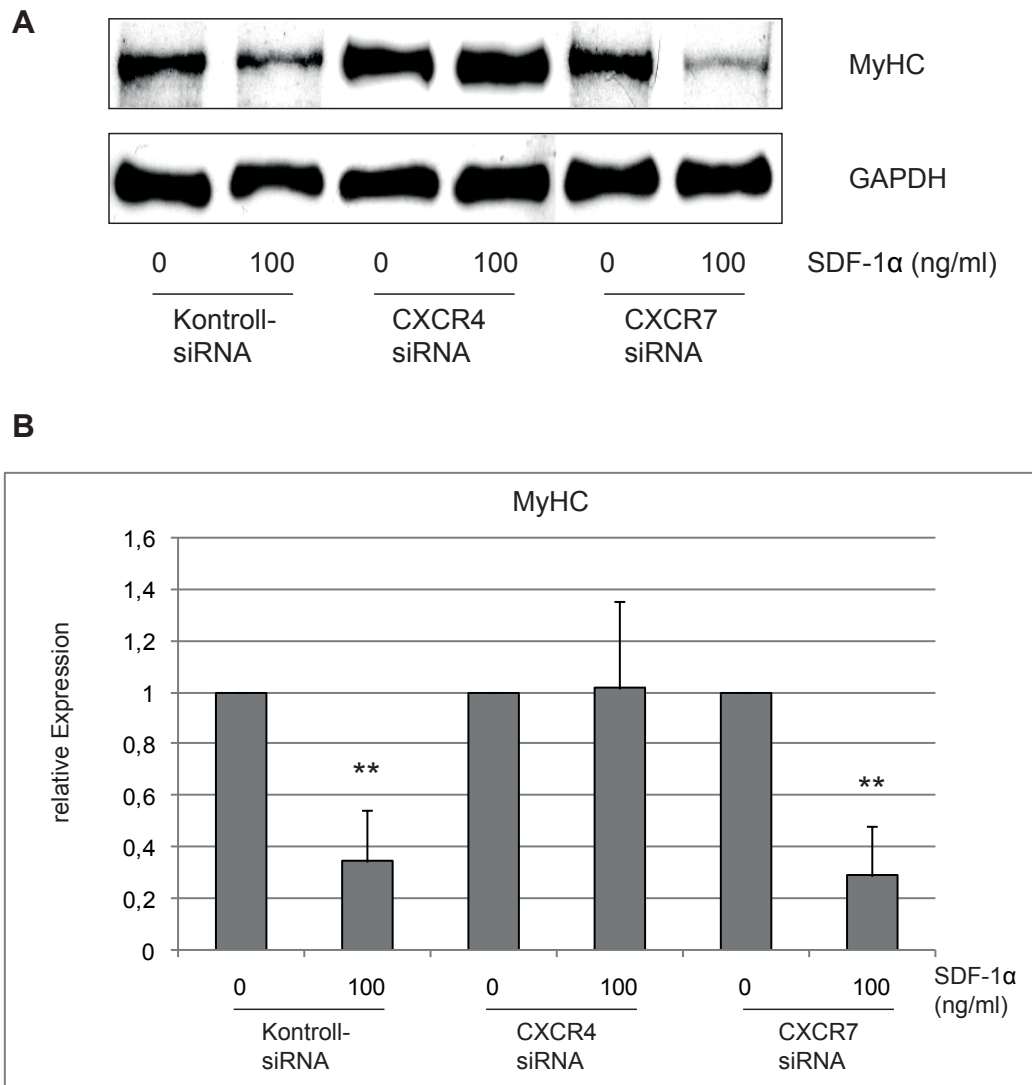
Zunächst erfolgte die Überprüfung der Myogeninexpression. Dafür wurden die Zellen mit der jeweiligen rezeptorspezifischen siRNA transfiziert, für drei Tage auf Differenzierungsmedium umgestellt und mit 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  behandelt. Die untransfizierten Kontrollen verhielten sich nach SDF-1 $\alpha$  - Stimulation wie bisher ermittelt (Abb. 4.20). Die CXCR4-transfizierten Zellen zeigten keine statistisch signifikante (Abb. 4.20B) Herunterregulierung der Myogeninexpression, so dass die Hemmwirkung des SDF-1 $\alpha$  komplett aufgehoben wurde (Abb. 4.20A). Im Gegensatz dazu gleicht die Reduzierung des Myogenin in CXCR7-transfizierten Zellen der Kontrolle. Die Hemmung durch SDF-1 $\alpha$  bleibt vollständig erhalten und reduziert Myogenin um ca. 60% (Abb. 4.20B). Als nächstes wurde die Expression von MyHC mit Hilfe des Westernblots überprüft. Die transfizierten Zellen zeigten erneut ein unterschiedliches Ergebnis. Wurde der CXCR4 herunterreguliert, blieb auch nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen die MyHC-Expression konstant und SDF-1 $\alpha$  hatte keinen hemmenden Einfluss. Umgekehrt zeigte sich die MyHC-Expression nach einer Transfektion des CXCR7. Der hemmende Einfluss von SDF-1 $\alpha$  auf die MyHC-Expression blieb vollständig erhalten (Abb. 4.21). Die so ermittelten Ergebnisse decken

#### 4. ERGEBNISSE

sich mit denen aus den Experimenten mit den pharmakologischen Antagonisten und bilden somit eine Bestätigung der bisher gewonnen Erkenntnisse.



**Abbildung 4.20: Myogeninexpression in siRNA-transfizierten C2C12-Zellen.** (A) Die Kontrolle zeigt den bisher ermittelten hemmenden Einfluss des SDF-1α auf die Myogeninexpression. Dieser entfiel nach einer Transfektion der Zellen mit einer spezifischen siRNA gegen CXCR4. Eine durch spezifische siRNA erzielte Reduzierung der CXCR7-Expression zeigte keinen Einfluss auf den Hemmeffekt des Liganden. (B) Die Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigten eine statistisch signifikante Hemmung der Myogenin-Expression um ca. 65%. Diese verschwand, wenn die Zellen mit einer CXCR4-siRNA behandelt wurden. Bei einer Transfektion der Zellen mit siRNA gegen CXCR7 blieb die statistisch signifikante Hemmung der Myogenin-Expression um 60% erhalten. n=3-7, \*\*p<0,01.



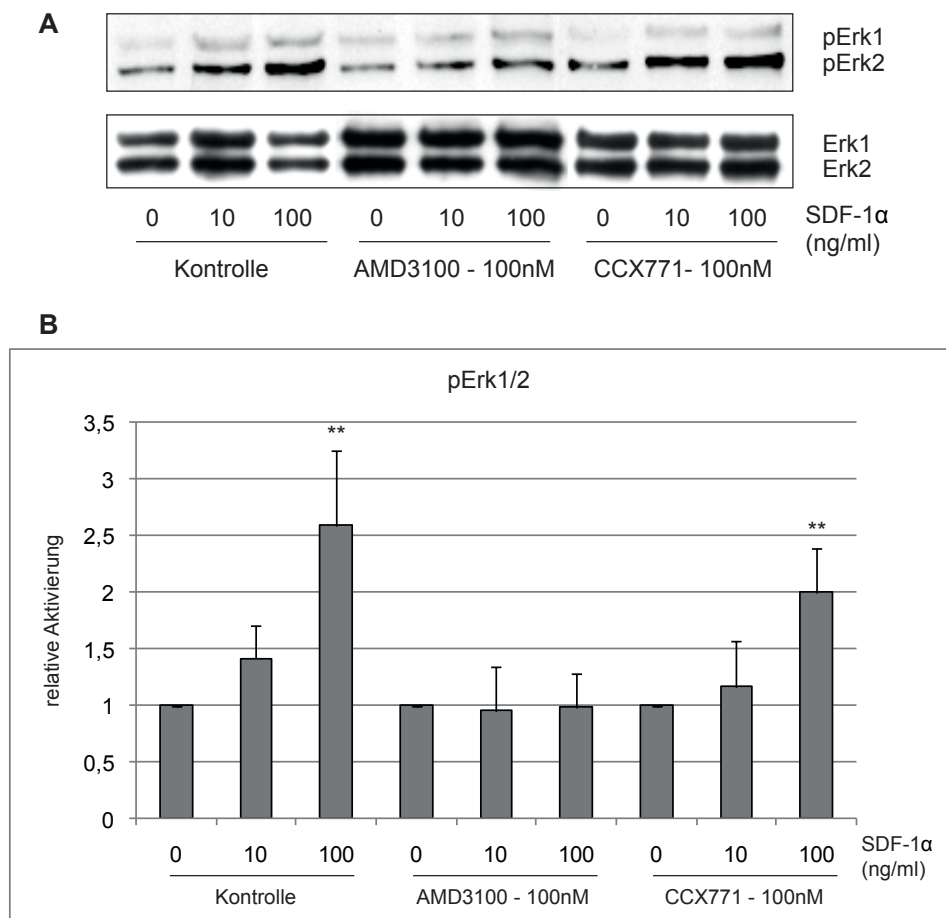
**Abbildung 4.21: MyHC-Expression in siRNA-transfizierten C2C12-Zellen.** (A) Der Westernblot zeigte unter der Kontroll-siRNA eine Hemmung der MyHC-Expression. Enthielten die Zellen kaum noch CXCR4 verschwand der hemmende Einfluss des SDF-1α auf das Protein. Die Hemmung blieb vollständig erhalten, wenn die Zellen keinen CXCR7 mehr aufwiesen. (B) Quantitativ hemmte SDF-1α in der Kontrolle die MyHC-Expression um 65% statistisch signifikant. Die Transfektion des CXCR4 hob den Effekt des SDF-1α vollständig auf. Bei einer Transfektion des CXCR7 blieb der hemmende Effekt des Liganden vollständig erhalten. n=3-7, \*\*p<0,01.

### 4.4 Die Signalwege

#### 4.4.1 CXCR4 vermittelt SDF-1 $\alpha$ -induzierte Signale

ÖDEMIS et al. (2007) konnten bereits aufklären, dass der MAP-Kinase Signalweg (Erk) einen SDF-1 $\alpha$ -abhängigen Einfluss auf die Proliferation und Migration der C2C12-Zellen vermittelt. Im Gegensatz dazu kontrolliert SDF-1 $\alpha$  über den PKC-Signalweg (spezifisch PKC $\zeta/\lambda$ ) die Differenzierung. Bei anderen Signalwegen wie dem PI3-Kinase-Akt Signalweg oder der PKC $\alpha/\beta$  konnte keine Aktivierung durch SDF-1 $\alpha$  festgestellt werden (ÖDEMIS et al. 2007). Daraus resultierend stellte sich die Frage, welcher Rezeptor spezifisch für die Aktivierung der beteiligten Signalwege verantwortlich ist.

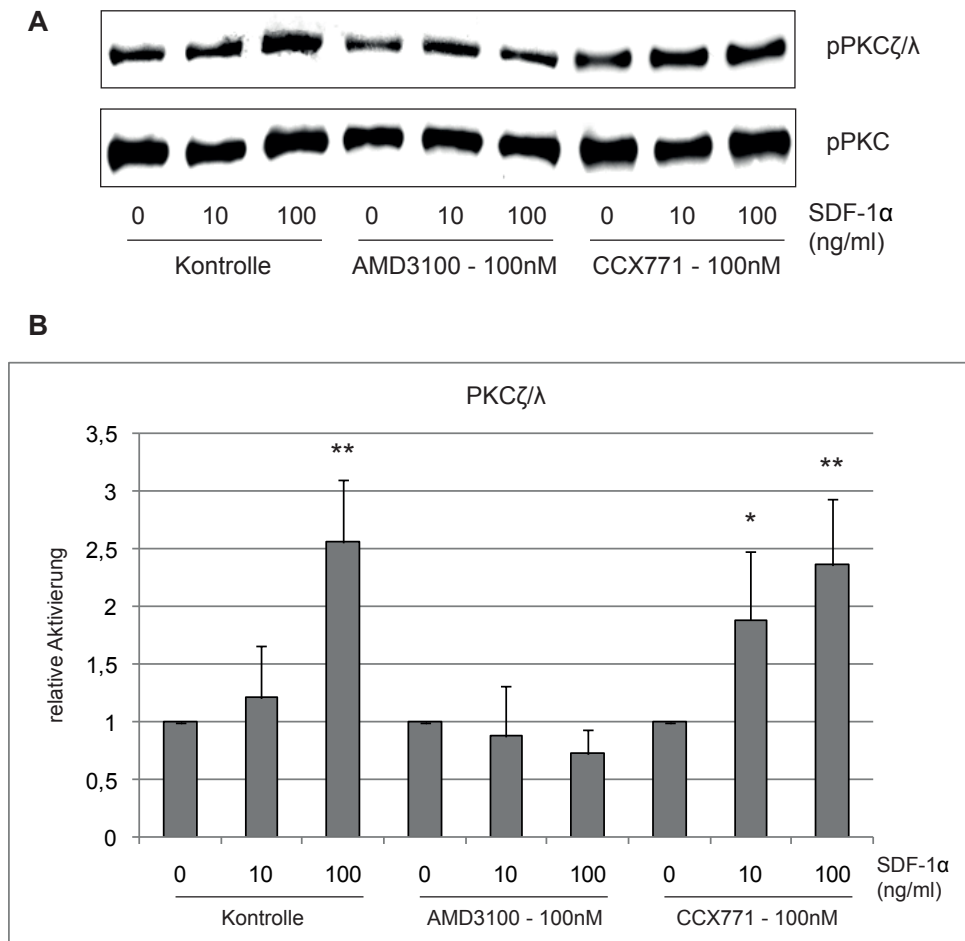
Im Folgenden fand die Untersuchung des MAP-Kinase und des Protein Kinase C-Signalwegs statt. Hierzu wurden im Kontrollexperiment die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von SDF-1 $\alpha$  stimuliert. Der repräsentative Westernblot (Abb. 4.22A) zeigt eine deutliche Zunahme des phosphorylierten Erk1/2 bei einer Stimulation mit 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  (Abb. 4.23). Ebenso erfolgte eine statistisch signifikante Phosphorylierung des PKC $\zeta/\lambda$  unter dem Einfluss von SDF-1 $\alpha$  (Abb. 4.23B). Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit AMD3100. Die daraufhin analysierten Signalwegproteine zeigten eine deutlich verminderte Aktivierung (Abb. 4.22A, Abb. 4.23A). Völlig anders erscheint das Ergebnis nach einer CXCR7-Blockierung mit CCX771 (100 nM). Es zeigte sich weiterhin eine Aktivierung beider untersuchter Signalmoleküle. Sowohl das phosphorylierte Erk1/2, als auch PKC $\zeta/\lambda$  stiegen statistisch signifikant an (Abb. 4.22B, Abb. 4.23B).



**Abbildung 4.22: Untersuchung des Signalmoleküls Erk1/2 unter Blockierung von CXCR4 und CXCR7, n=5-6, \*\*p<0,01.** (A+B) Die Kontrolle zeigte im Westernblot eine Phosphorylierung des Erk1/2 unter SDF-1α-Stimulation. Diese entfiel, als der CXCR4 mit seinem pharmakologischen Antagonisten (AMD3100, 100 nM) blockiert wurde. Im Gegensatz dazu blieb die Aktivierung des Signalmoleküls unter der Antagonisierung von CXCR7 statistisch signifikant erhalten.



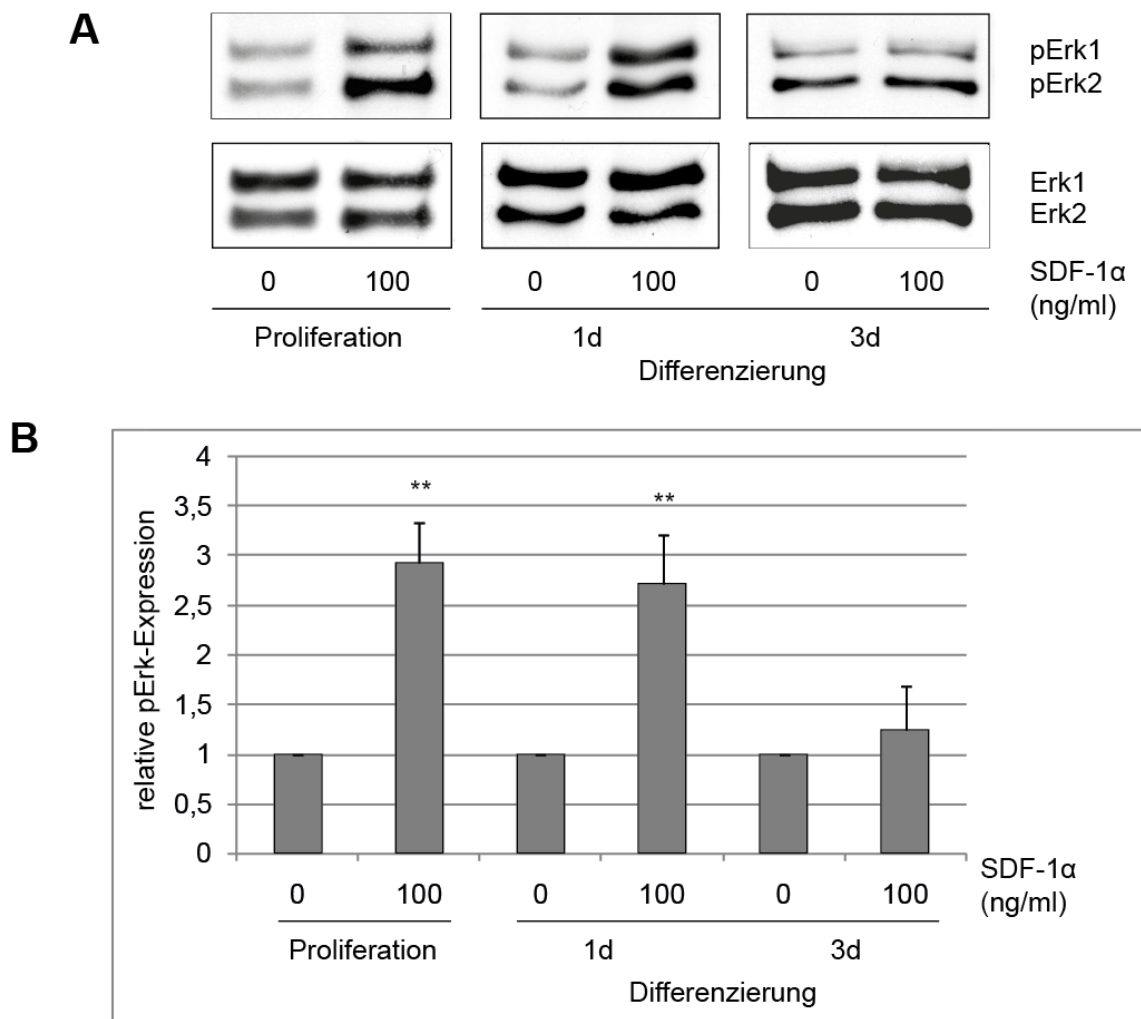
## 4. ERGEBNISSE



**Abbildung 4.23: Untersuchung des Signalmoleküls PKC $\zeta/\lambda$  unter Blockierung von CXCR4 und CXCR7, n=5-6, \*\*p<0,01.** (A) Die Stimulation mit SDF-1 $\alpha$  führte zu einer erhöhten Phosphorylierung des PKC $\zeta/\lambda$ . Bei der Blockierung des CXCR4 erfolgte keine statistisch signifikante Aktivierung des Signalproteins mehr. Im Gegensatz dazu blieb die Phosphorylierung trotz der Hemmung des CXCR7 vollständig erhalten.

### 4.4.2 Der MAP-Kinase-Signalweg im Zeitverlauf

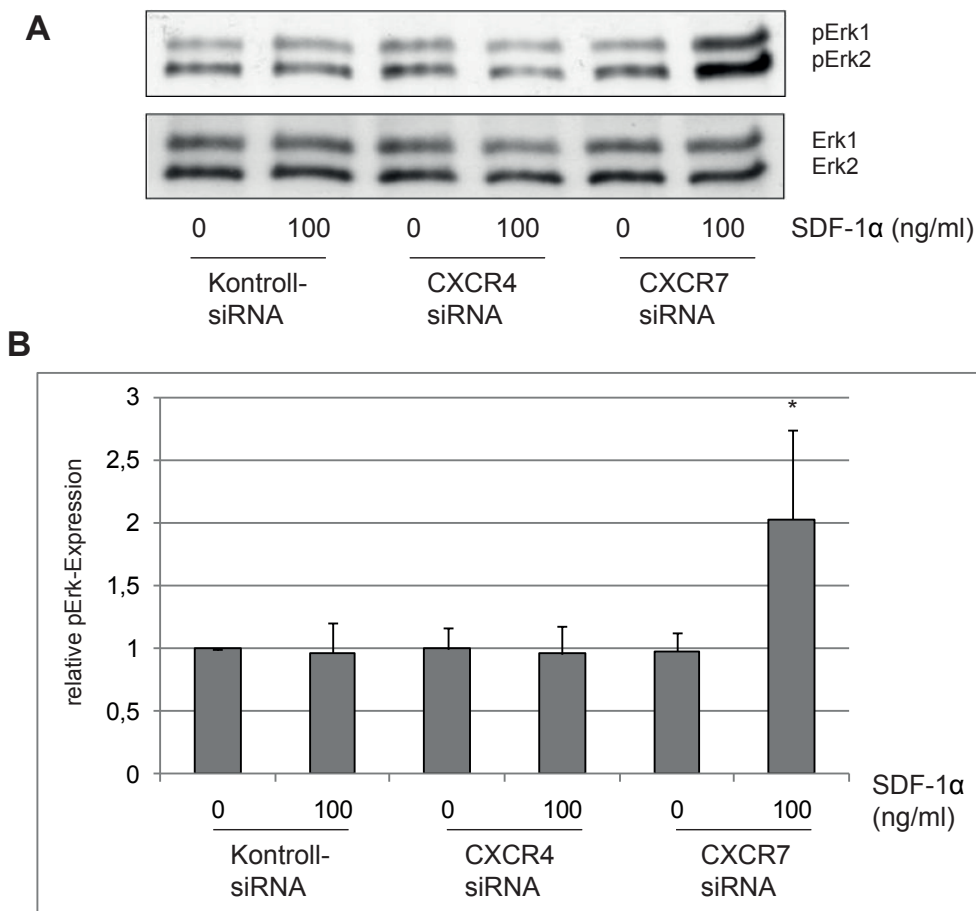
Die bisherigen Signalwegexperimente wurden an undifferenzierten Zellen durchgeführt. Da jedoch CXCR7 unter Differenzierungsbedingungen verstärkt exprimiert wird, sollte als nächstes geklärt werden, wie sich die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs im Verlauf von drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen verhält. Hierfür wurden die C2C12-Zellen unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen mit 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  stimuliert und die Phosphorylierung von Erk1/2 analysiert. Unter Proliferationsbedingungen fand eine Aktivierung des Signalweges durch SDF-1 $\alpha$  statt (Abb. 4.24A).



**Abbildung 4.24: Signalmolekül Erk1/2 unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen.** (A) Der Westernblot zeigte unter Proliferationsbedingungen eine deutliche Aktivierung von Erk1/2, welche statistisch signifikant war (B). Diese war auch am ersten Tag der Differenzierung nachweisbar (A) und ebenso statistisch signifikant (B). Am dritten Tag unterblieb diese Aktivierung (A). Die quantitative Analyse zeigte keine statistisch signifikante Phosphorylierung von Erk1/2 mehr (B).  $n=4$ ,  $**p<0,01$ .

Quantitativ zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg des aktivierten Erk1/2 um das Dreifache (Abb. 4.24B). Nach einem Tag unter Differenzierungsbedingungen zeigte sich ebenfalls eine Aktivierung des Signalmoleküls (Abb. 4.24A) und es konnte eine um das Dreifach erhöhte Erk-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Aktivierung ist ebenfalls signifikant (Abb. 4.24B). Am dritten Tag unter Differenzierungsbedingungen (Abb. 4.24A) ließ sich keine durch SDF-1 $\alpha$  induzierte Phosphorylierung des Erk1/2 mehr nachweisen. Auch die quantitative Analyse des Experimentes, zeigte nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen keine statistisch signifikante Phosphorylierung von Erk1/2 (Abb. 4.24B).

#### 4. ERGEBNISSE



**Abbildung 4.25: Signalmolekül Erk1/2 in transfizierten Zellen nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen.** Der Westernblot zeigte keine Phosphorylierung von Erk1/2 in den Kontrollen nach der Stimulation mit SDF-1α (A). Ebenso unterblieb die Signalwegaktivierung bei den CXCR4-transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu ließ sich eine statistisch signifikante (B) Erhöhung des phosphorylierten Erk1/2 nach SDF-1α-Stimulation in CXCR7-transfizierten Zellen detektieren (A). n=4, \*p<0,05.

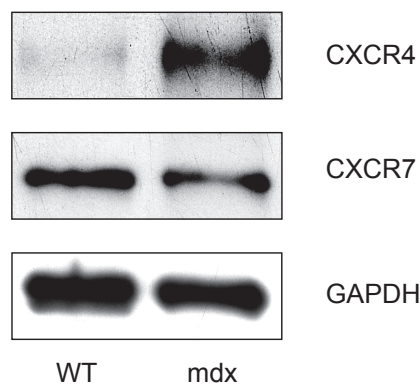
Um zu klären, ob die zunehmende CXCR7-Expression im Laufe der Differenzierung für die fehlende Signalmolekülaktivierung verantwortlich ist, erfolgte eine Transfektion differenzierter Zellen mit einer rezeptorspezifischen siRNA. Danach wurden die Zellen mit SDF-1α stimuliert und das Signalprotein Erk1/2 untersucht. Die Kontrolle wies keinen Anstieg des phosphorylierten Erk1/2 auf. Ebenso unterblieb eine Aktivierung des Signalweges in C2C12-Zellen mit gehemmter CXCR4-Expression (Abb. 4.25A). Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant (Abb. 4.25B). Völlig gegensätzlich präsentierte sich die Analyse der mit spezifisch gegen CXCR7 gerichteten siRNA transfizierten Zellen. Hier kommt es zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von Erk1/2 und somit zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges (Abb. 4.25B).

## 4.5 CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$ in der mdx-Maus

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass SDF-1 $\alpha$  die Myogenese über CXCR4 moduliert und zusätzlich CXCR7 das Signalverhalten von CXCR4 dämpft. Damit stellte sich als nächstes die Frage, ob die Expression beider Rezeptoren auch in geschädigter Muskulatur einer Regulation unterliegt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die mdx-Maus verwendet, welche eine Spontanmutation im Dystrophin-Gen trägt und somit als Tiermodell für die Duchenn'sche Muskelerkrankung steht. Sie zeigt kontinuierlich nekrotische Muskulatur, gefolgt von Phasen der Regeneration im ersten Lebensjahr. Die hier untersuchten Tiere waren 6 Monate alt (adult). Verwendet wurde erneut der M. quadriceps femoris, um eine Expressionsanalyse von CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$  durchzuführen.

### 4.5.1 Westernblot

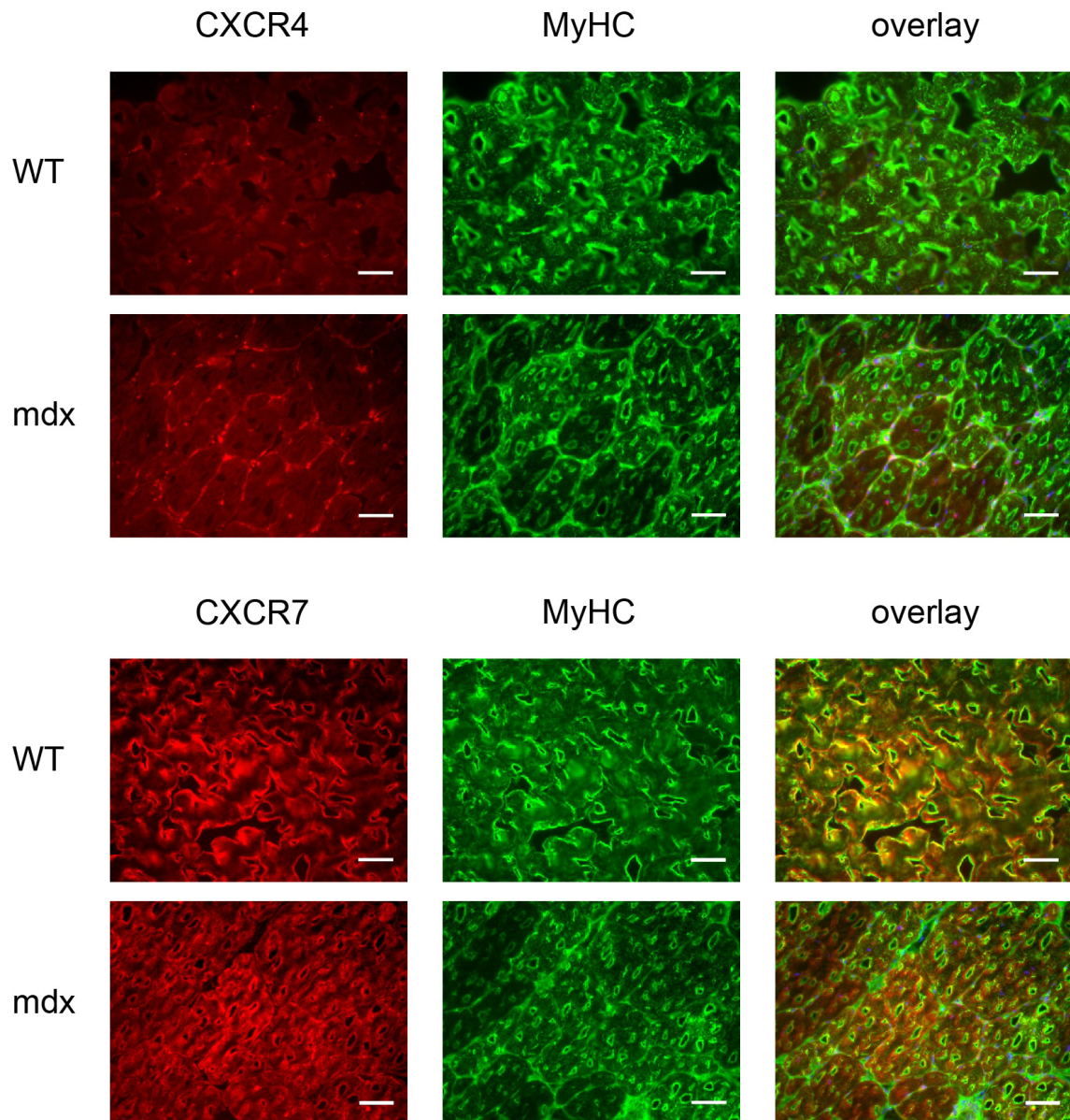
Als erstes wurde ein Westernblot aus Muskelhomogenaten durchgeführt und die beiden Rezeptoren analysiert. Der Wildtyp zeigte keine Expression des CXCR4, wobei der CXCR7 deutlich erkennbar war (Abb. 4.26 WT). Im Gegensatz dazu war die Expression des CXCR4 in der mdx-Maus deutlich erhöht. Das Expressionslevel von CXCR7 entsprach hingegen dem des Wildtypes (Abb. 4.26 mdx).



**Abbildung 4.26: Expression von CXCR4 und CXCR7 bei Wildtyp (WT)- und mdx-Mäusen im Vergleich.** Der Westernblot zeigt eine deutliche Zunahme der CXCR4-Expression in der mdx-Maus, während CXCR7 sowohl im WT, als auch im mdx-Tier gleichermaßen exprimiert wird. GAPDH diente zur Standardisierung.

### 4.5.2 Immunhistochemie

Eine nachfolgende immunhistochemische Anfärbung von CXCR4 und CXCR7 in Kryoschnitten zeigt, dass CXCR4 und CXCR7 in Muskelfasern exprimiert werden. Abbildung 4.27 zeigt im oberen Bereich die Doppelmarkierung des CXCR4-Rezeptors und des MyHC im Wildtyp und in der mdx-Maus. Hierbei wiederholte sich im Wildtyp, dass kaum eine Expression des CXCR4 in der Färbung wahrnehmbar war. Im Gegensatz dazu veränderte sich das Bild in der mdx-Maus. Einerseits lassen sich rundliche Zellen erkennen, andererseits ließ sich eine deutliche immunhistochemisch positive Abgrenzung fast aller Muskelfasern erkennen. Dies spricht für eine erhöhte Expression des CXCR4 in der Muskulatur der mdx-Maus. Im unteren Bereich der Abbildung 4.27 ist die Doppelmarkierung eines Schnittes mit Antikörpern gegen CXCR7 und MyHC dargestellt. Diese Färbung entspricht sowohl im Wildtyp, als auch in der mdx-Maus unseren vorhergehenden Ergebnissen und belegt den durchgeführten Westernblot. CXCR7 unterliegt keiner Regulation in der mdx-Maus.



**Abbildung 4.27: Immunhistochemischer Nachweis der CXCR4 und CXCR7 Expression in Wildtyp (WT)- und mdx-Mäusen.** Die Immunhistochemie des CXCR4 (rot) zeigt im WT eine sehr geringe Expression, welche in der mdx-Maus stark zunimmt. Die Doppelmarkierung beweist eine Koloalistaion mit dem grün markierten Muskelgewebe. Der CXCR7 (rot) wird sowohl im WT, als auch in der mdx-Maus auf gleichbleibenden Niveau exprimiert. Dapi (blau) = Zellkerne, Maßstab: 50  $\mu$ m.

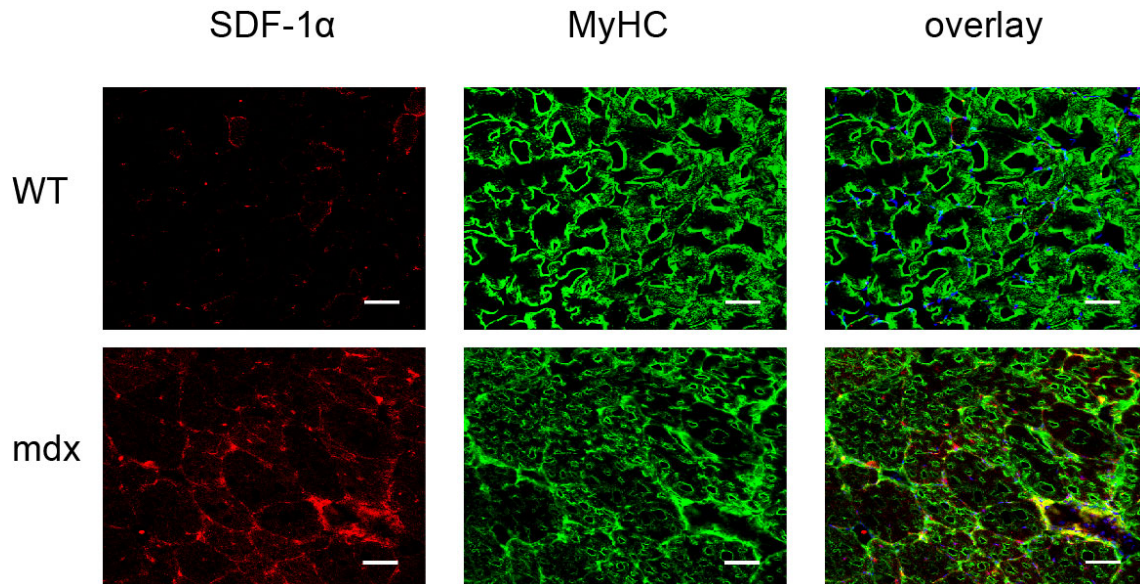
Abschließend stellte sich die Frage, ob neben der Regulation des CXCR4 in der mdx-Maus, auch SDF-1 $\alpha$  einer Regulation unterliegt. Erneut wurde an den Kryoschnitten eine Doppelmarkierung mit SDF-1 $\alpha$  und MyHC vorgenommen. Im Wildtyp war die Verteilung von SDF-1 $\alpha$  wie bereits beschrieben. Es sind nur wenige SDF-1 $\alpha$  positive Bereiche im Endomysium zu erkennen (Abb. 4.28). Im Vergleich dazu erschien bei der mdx-Muskulatur



#### 4. ERGEBNISSE

---

ein völlig verändertes Bild. Das Endomysium weist eine deutliche Anfärbung von SDF-1 $\alpha$  auf und hebt die einzelnen Muskelfasern scharf voneinander ab (Abb. 4.28). Somit glich das Expressionsmuster des SDF-1 $\alpha$  dem des CXCR4.



**Abbildung 4.28: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 $\alpha$  bei Wildtyp (WT)- und mdx-Mäusen.** Die Aufnahmen zeigen einen niedrigen Anteil von SDF-1 $\alpha$  (rot) im Endomysium des WT. Dieser nimmt deutlich in der mdx-Maus zu und führt zu einer „Markierung“ der einzelnen Muskelfasern (grün). Dapi (blau) = Zellkerne, Maßstab: 50  $\mu$ m.

## 5 Diskussion

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass nicht nur klassische Regulationsfaktoren wie HGF, FGF oder IGF bei der Entwicklung der Muskulatur eine Rolle spielen (BIRCHMEIER und GHERARDI 1998, ITOH et al. 1996, BARTON-DAVIS et al. 1998). Tatsächlich zeigen CXCR4 Knock-out Tiere neben massiven Fehlbildungen verschiedenster Organe, auch eine massiv gestörte Muskelentwicklung, so dass eine Beteiligung der Chemokine an der Myogenese wahrscheinlich wurde. ÖDEMIS et al. (2007) konnten einen Teil der Funktion des SDF-1 $\alpha$  und dessen Rezeptors CXCR4 in der Myogenese mit Hilfe von C2C12-Zellen aufklären. So hat SDF-1 $\alpha$  einen positiven Effekt auf die Proliferation und Migration von C2C12-Zellen, inhibiert jedoch deren Differenzierung. Zusätzlich konnten die beteiligten Signalwege aufgeklärt werden. Hierbei zeigte sich, dass der MAP-Kinase Signalweg (Erk) für die Proliferation und Migration der Zellen verantwortlich ist, während der PKC-Signalweg (spezifisch PKC $\zeta/\lambda$ ) die Differenzierung beeinflusst. Bisher wurde angenommen, dass SDF-1 $\alpha$  seine Funktion ausschließlich über den CXCR4 vermittelt, bis 2005 CXCR7 als weiterer Rezeptor entdeckt wurde. Dieser weist eine wesentlich höhere Affinität für SDF-1 $\alpha$  auf und wird häufig mit CXCR4 ko-exprimiert. Damit stellten sich folgende Fragen: 1. Wie ist der Expressionsverlauf beider Rezeptoren in *in vivo* und *in vitro*? 2. Welche Rolle spielen beide Rezeptoren im Laufe der Differenzierung von C2C12-Zellen und welche Signalwege sind daran gekoppelt? 3. Wie ist die Expression und Funktion beider Rezeptoren während der Muskelregeneration am Beispiel der mdx-Maus?

### 5.1 CXCR4- und CXCR7-Expression *in vivo*

Da beide Rezeptoren häufig in den selben Gewebetypen angetroffen werden, stellte sich als erstes die Frage, ob beide Rezeptoren in der Muskulatur über einen längeren Zeitraum exprimiert werden. Es wurden Kryoschnitte vom Oberschenkel der C57BL/6-Mäuse am E18, P3, P16 und von adulten Tieren angefertigt und immunhistochemisch untersucht. Embryonale Tiere zeigten eine vornehmliche Lokalisation des CXCR4 in den einzelnen Muskelfasern, homogen über den gesamten Muskel verteilt (Abb. 4.1). Dies deckt sich mit den Beschreibungen von ÖDEMIS et al. (2005), welche erstmals den Rezeptor immunhistologisch in Muskelfasern von E18 Mäusen darstellten. Vergleichbare Befunde liegen für die Expression des Rezeptors während der Gliedmaßenentwicklung in Hühnerembryonen vor, wo CXCR4 ebenfalls in Muskelfasern vorliegt (YUSUF et al. 2005). Bisher gibt es nur wenige Hinweise auf den zeitlichen Expressionsverlauf beider Rezeptoren während der Muskelentwicklung. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CXCR4 am dritten Tag postnatal nur noch geringgradig in den Muskelfasern exprimiert wird. Das Rezeptorlevel nimmt weiter ab und ist im Erwachsenenalter immunhistochemisch nicht mehr nachweisbar (Abb. 4.1). Interessanterweise zeigt sich ein gegenläufiges Bild bei der Expression des CXCR7. Dieser wird in der embryonalen Muskulatur schwach exprimiert



(Abb. 4.2). Es ist jedoch eine Lokalisation im Bereich der Muskelfaser zu erkennen. Bis zum dritten postnatalen Tag nimmt die Expression von CXCR7 deutlich zu. Dieser hohe Expressionslevel bleibt erhalten. Auch im adulten Tier ist CXCR7 in den Muskelfasern lokalisiert, was unterstreicht, dass beide Rezeptoren in der Muskulatur vorkommen. Festzuhalten ist jedoch, dass beide Rezeptoren ein gegenläufiges Expressionslevel zeigen. Die Expression von CXCR4 nimmt im Laufe der Entwicklung ab, während CXCR7 postnatal einen Anstieg aufweist. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein Westernblot (Abb. 4.4) und eine quantitative Genanalyse (Abb. 4.5) durchgeführt, welche die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bestätigten. Das Expressionsmuster ist bereits aus einem anderen Gewebe bekannt. GÖTTLE et al. (2010) untersuchte an optischen Nerven die Expression und den postnatalen Expressionsverlauf von CXCR4 und CXCR7. Hierbei zeigte sich, dass beide Rezeptoren exprimiert werden. Der CXCR4 unterliegt jedoch postnatal einer Herunterregulierung, während der CXCR7 um das Doppelte ansteigt. Dies konnte im Nerv sowohl in der Immunhistochemie als auch im Western Blot und bei der Genexpression gezeigt werden.

Aus der embryonalen Entwicklung ist bekannt, dass SDF-1 $\alpha$ , der natürliche Ligand von CXCR4 und CXCR7, im umliegenden Bindegewebe der Muskulatur exprimiert wird (VASYUTINA et al. 2005, ÖDEMIS et al. 2005). Allerdings wurde in keiner der vorhergehenden Publikationen nach dem Vorkommen von SDF-1 $\alpha$  in späteren Entwicklungsphasen geschaut. Damit stellte sich für vorliegende Arbeit die Frage, ob SDF-1 $\alpha$  auch in nachfolgenden Entwicklungsstadien exprimiert wird. Das bisher bekannte embryonale Expressionsmuster von SDF-1 $\alpha$  in mesenchymalen Strukturen (ÖDEMIS et al. 2005) konnte bestätigt werden. Die SDF-1 $\alpha$ -Expression persistierte bis ins adulte Stadium. Hier fand sich das Chemokin in dem die Muskelfaser umgebenden Bindegewebe, war jedoch nicht in der Muskelfaser selbst zu finden (Abb. 4.3). Die Anfärbung der Schnitte mit Antikörpern gegen Laminin und Fibronectin zeigte, dass SDF-1 $\alpha$  nicht in der Basallamina der Zelle, sondern unter anderem in fibronectin-positiven Fibroblasten lokalisiert ist. Damit bestätigten sich die endomysialen Zellen als Ursprung des SDF-1 $\alpha$ . Bisher konnte gezeigt werden, dass SDF-1 $\alpha$  mehrere Funktionen während der Muskelentwicklung übernimmt. So ist es einerseits entscheidend für die korrekte Wanderung der Vorläuferzellen in die Extremitätenknospen auf Grund seiner chemotaktischen Wirkung. Andererseits bewirkt es im Bereich der zukünftigen Muskulatur eine Hemmung der Differenzierung und stimuliert gleichzeitig die Proliferation der Myoblasten (ÖDEMIS et al. 2007). Interessanter Weise stellten MELCHIONNA et al. (2010) eine autokrine Expression des Faktors an C2C12-Zellen fest. Im Gegensatz dazu bewiesen GRIFFIN et al. (2010), dass auch bei fehlenden Myoblasten SDF-1 $\alpha$  im Gewebe nachweisbar ist. Woher genau dieses exogene

SDF-1 $\alpha$  stammt ist bisher unklar und bietet Ansätze für weitere Untersuchungen. Doch auch der Fakt, dass SDF-1 $\alpha$  in späten Entwicklungsstadien bis hin zum adulten Tier in der Muskulatur nachgewiesen werden konnte, welche nachweislich ausdifferenziert ist, bedarf der Klärung. Da das Endomysium neben den eigentlichen Muskelfasern zusätzlich Satellitenzellen umschließt, wäre es möglich, dass SDF-1 $\alpha$  in die Kontrolle von Muskelvorläuferzellen bei Verletzungen involviert ist. Im Falle einer Muskelregeneration müssten alle Entwicklungsphasen von der Vorläuferzelle bis zur Muskelfaser erneut durchlaufen werden und das SDF-1 $\alpha$ -System wäre erneut gefragt.

## 5.2 C2C12-Zellen als Modellsystem für Proliferation und Differenzierung

Für die Untersuchung des Beitrages von CXCR4 und CXCR7 zur Kontrolle der Myogenese und zur SDF-1 $\alpha$ -abhängigen Signalwegaktivierung wurden C2C12-Zellen eingesetzt. Sie stellen ein etabliertes Modellsystem der Myogenese dar, in welchem molekulare Mechanismen ohne den Einfluss kontaminierender Fibroblasten untersucht werden können (YAFFE und SAXEL 1977). Um diese Zellen erfolgreich einzusetzen, wurde auf ein bereits wiederholt publiziertes Kultivierungsschema zurückgegriffen (CABANE et al. 2003, ÖDEMIS et al. 2007). Der hier verwendete Zellpool zeigte die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften. Bei hohen Serumkonzentrationen kam es zur Proliferation der C2C12-Zellen (Abb. 4.6A). Unter dreitägiger Serumreduktion erfolgte die Ausdifferenzierung der Zellen (Abb. 4.6B). Zusätzlich wurde der frühe Differenzierungsmarker Myogenin bestimmt. Dieser stieg mit zunehmender Kultivierungsdauer an (Abb. 4.6C) und entsprach somit der Beschreibung in der Literatur (ANDRÉS und WALSH 1996, ÖDEMIS et al. 2007). Zusätzlich bestätigte sich die Differenzierung durch einen Anstieg der MyHCs (Abb. 4.6D), welche einen späteren Marker für differenzierte Muskelzellen darstellen (BADER et al. 1982).

### 5.2.1 CXCR4 und CXCR7

Anschließend stellte sich die Frage, ob die C2C12-Zelllinie beide Chemokinrezeptoren adäquat exprimiert und somit für die Untersuchung des Einflusses auf die Differenzierung geeignet ist. Ebenso wie bei MELCHIONNA et al. (2010) waren CXCR4 und CXCR7 unter Proliferationsbedingungen detektierbar (Abb. 4.7). Sowohl FACS (Abb. 4.9C), als auch Immunhistochemie (Abb. 4.11) zeigten, dass im Laufe der Differenzierung CXCR4 auf dem selben Expressionslevel verblieb, während CXCR7 hingegen einen deutlichen Anstieg mit zunehmender Differenzierung zeigte (Abb. 4.9C, 4.11). Diese Zunahme des CXCR7 deckt

sich mit der *in vivo* beobachteten Situation und genehmigt *in vitro* gewonnene Rückschlüsse. Ebenso bestätigte sich dieser Expressionsverlauf des CXCR7 in den von GÖTTLE et al. (2010) untersuchten Rattenoligodendrozyten. Hier erfolgte ebenfalls nach mehrtägiger Kultivierungsdauer ein signifikanter Anstieg des CXCR7. Das Vorhandensein beider Rezeptoren lässt nun die Frage nach deren separaten Aufgaben in der Differenzierung zu. Da der CXCR7 im proliferativen Zustand nur schwach exprimiert wird und erst im Verlauf der Differenzierung ansteigt, scheint seine Hauptfunktion in diesem späteren Abschnitt der Entwicklung zu liegen und weniger im Bereich der Proliferation.

### 5.2.2 SDF-1 $\alpha$ hemmt die Zelldifferenzierung

Während die Expression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen unumstritten ist, herrscht bei der Funktionsweise des SDF-1 $\alpha$  Uneinigkeit. ÖDEMIS et al. (2007) untersuchten C2C12-Zellen, welche mit SDF-1 $\alpha$  behandelt wurden und danach zwei Tage ausdifferenzierten. Hierbei zeigte sich ein hemmender Effekt auf MyoD, Myogenin und MyHC. Dieser bestätigte sich zusätzlich an primären Myoblasten. Im Gegensatz dazu zeigten MELCHIONNA et al. (2010) eine durch SDF-1 $\alpha$  ausgelöste Steigerung des MyHC am ersten Tag der Differenzierung, welche jedoch bereits am zweiten Tag nicht mehr nachweisbar war. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung von SDF-1 $\alpha$  auf die Differenzierung von C2C12-Zellen erneut untersucht. Die Analyse erfolgte nach SDF-1 $\alpha$ -Stimulation und drei Tagen Differenzierung, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt definitiv ausdifferenziert sind und ein detektierbares Level der MyHCs aufweisen. Diese MyHCs zeigten unter jeder verwendeten SDF-1 $\alpha$ -Konzentration eine Hemmung der Differenzierung (Abb. 4.14B), wobei diese bereits ab einer Konzentration von 1,0 ng/ml signifikant war (Abb. 4.14D). Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Untersuchung der differenzierten Zellen (Abb. 4.15). Es bestätigte sich der hemmende Einfluss von SDF-1 $\alpha$ . Die Kultur zeigte einen verringerten Anteil an differenzierten und somit MyHC-positiven Zellen. Ebenso fielen weniger mehrkernige und zu Myotuben verlängerte C2C12-Zellen auf. Zusätzlich kam es nach den hier durchgeführten Untersuchungen zu einer signifikanten Hemmung des untersuchten Myogenins unter 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  (Abb. 4.14C). Diese Ergebnisse bestätigten die Untersuchungen von ÖDEMIS et al. (2007) und somit den hemmenden Einfluss von SDF-1 $\alpha$  auf die Differenzierung der C2C12-Zellen. Damit stellte sich Frage, welche Rolle CXCR4 und CXCR7 bei dieser Differenzierungshemmung spielen.

### 5.2.3 SDF-1 $\alpha$ hemmt die Differenzierung der C2C12-Zellen über den CXCR4

CXCR4 gilt als klassischer G-Protein-gekoppelte Rezeptor. Seine Funktionen sind z.B. das Initiieren des Wachstums und die Migration von B-Lymphozyten (BROXMEYER 2001), er steuert die Morphogenese des Zentralnervensystems (LI und RANSOHOFF 2008) über die Regulierung des Ca<sup>2+</sup>-Einstrom oder die Aktivierung von Signalwegen (ÖDEMIS et al. 2010) und fördert den Eintritt von HI-Viren (FENG et al. 1996). Für den CXCR7 sind bisher je nach Zelltyp unterschiedliche Funktionen bekannt. Er ist sowohl in der Lage klassische G-Proteine (ÖDEMIS et al. 2012), als auch  $\beta$ -Arrestin 2 (ZABEL et al. 2009, KALATSKAYA et al. 2009) in Astrozyten (ÖDEMIS et al. 2010) zu aktivieren. Eine weitere Funktion zeigt sich in der Heterodimerisierung mit CXCR4 um dessen Signalwegaktivierung zu modulieren und so z.B. die Migration von T-Zellen zu beeinflussen (LEVOYE et al. 2009). Eine weitere beschriebene Funktion des CXCR7 ist die eines „Scavengers“. Hierbei bindet er durch seine höhere Affinität zu SDF-1 $\alpha$  dieses Chemokin und moduliert so einen SDF-1 $\alpha$ -Gradienten, an welchem sich primordiale Keimzellen im Zebrafisch zur zielgerichteten Wanderung in die Keimzellanlagen bewegen (NAUMANN et al. 2010, BOLDAJIPOUR et al. 2008). Welche Funktion CXCR7 in der Muskeldifferenzierung übernimmt, ist bisher nicht ausreichend bekannt und soll in dieser Arbeit nachfolgend definiert werden.

Als erstes erfolgte die Blockierung je einer der beiden Rezeptoren mit ihren spezifischen pharmakologischen Hemmern und die Untersuchung der Differenzierung. Hierbei wird AMD3100 als Blocker für CXCR4 verwendet. Dieser Blocker kann jedoch nur zu ersten Hinweisen der Funktion des CXCR4 verhelfen, da nachgewiesen wurde, dass er besonders in höheren Konzentrationen ebenfalls einen Effekt auf CXCR7 ausübt (KALATSKAYA et al. 2009). Die hier verwendete Konzentration von 100 nM zeigte keinen unspezifischen Einfluss auf die Myogenin- und MyHC-Expression (Abb. 4.16A). Die Blocker CCX733 und CCX771 für den CXCR7 werden hingegen als spezifisch für diesen Rezeptor eingestuft (ZABEL et al. 2009) und zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die Differenzierung der C2C12-Zellen (Abb. 4.16B). Im Gegensatz zur vorher beschriebenen Hemmung der Differenzierung durch SDF-1 $\alpha$  führte die pharmakologische Blockierung des CXCR4 zu einer Aufhebung dieses Effekts und somit blieb die Expression von Myogenin und MyHC völlig unbeeinflusst (Abb. 4.17A2, Abb. 4.18A2). Hierbei blieb die Hemmwirkung von SDF-1 $\alpha$  vollständig erhalten. Dieser Umstand beweist eine aktive Funktion des CXCR4 bei der Hemmung der Differenzierung durch SDF-1 $\alpha$ . Die aufgehobene Hemmwirkung des SDF-1 $\alpha$  nach der Blockierung des CXCR4 deckt sich mit Beobachtungen von GRIF-FIN et al. (2010), welche in der Immunzytochemie nach der Blockierung des CXCR4 im

differenzierten Zustand weder eine reduzierte Anzahl an differenzierten Zellen noch eine reduzierte Anzahl an Zellkernen in den fusionierten Myoblasten feststellen konnten. Gegenätzlich scheint die Aussage von MELCHIONNA et al. (2010), nach der die Blockierung des CXCR4 durch 4FTN und AMD3100 zu einer Abnahme des MyHC führt. Hierbei muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass 4FTN prinzipiell zum Absterben von Zellen führen kann (BEIDER et al. 2011) und AMD3100 in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wurde. Diese hohe AMD3100-Konzentration könnte, wie bereits erwähnt, zur Beeinflussung des CXCR7 führen und einen zusätzlich agonistischen Effekt ausüben (KALATSKAYA et al. 2009). Da keine Kontrollbehandlungen der Zellen mit diesen Blockern gezeigt werden, könnte darin die Erklärung der Abnahme des MyHC unter Blockierung des CXCR4 liegen. Anders hingegen äußerte sich die Blockierung des CXCR7. Diese hat keinen Einfluss auf die Hemmwirkung des SDF-1 $\alpha$ , sodass Myogenin und MyHC signifikant weniger exprimiert werden, als in den unstimulierten Zellen (Abb. 4.17B, Abb. 4.18B). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von MELCHIONNA et al. (2010), wenn gleich dort nur 2 Experimente mit dem CCX733 durchgeführt wurden, welche keine statistische Aussage zulassen. Die Ergebnisse der Rezeptorblockierungen und deren Einfluss auf die Differenzierung zeigen, dass der eigentliche Effekt über den CXCR4 geht, der CXCR7 hingegen keinen aktiven Einfluss ausübt. Um die Ergebnisse der vieldiskutierten Blocker zu bekräftigen wurde zusätzlich eine Transfektion der C2C12-Zellen mit siRNA durchgeführt, um spezifisch mRNA zu blockieren und somit die Expression der Rezeptoren zu verhindern. Während MELCHIONNA et al. (2010) keine signifikanten Reduktionen der Rezeptoren erreichten, war es in dieser Arbeit möglich den CXCR4 um  $67 \pm 5\%$  und den CXCR7 um  $67 \pm 12\%$  herunterzuregulieren, so dass verbindliche Aussagen getroffen werden konnten. Sowohl die Hemmung des CXCR4, als auch des CXCR7 bestätigten die Ergebnisse der pharmakologischen Hemmer (Abb. 4.20A, Abb. 4.21A). Es konnte erneut eine Aufhebung des Hemmeffektes von SDF-1 $\alpha$  unter Abnahme des CXCR4-Levels beobachtet werden. Dieses Ergebnis an C2C12-Zellen entspricht den Beobachtungen von GRIFFIN et al. (2010) an primären Myoblasten, bei denen ebenfalls eine völlig normale Differenzierung, mit etwas schmalere Myotubes, unter SDF-1 $\alpha$  ohne den CXCR4 stattfand. Die Transfektion der C2C12-Zellen mit CXCR7-siRNA zeigte einen persistierenden Hemmeffekt des SDF-1 $\alpha$  und somit eine statistisch signifikant verringerte Expression von Myogenin und MyHC (Abb. 4.20B, Abb. 4.21B). Dadurch zeigt sich eindeutig die aktive Funktion des CXCR4 bei der Hemmung der Differenzierung und die weiterhin unklare Funktion des CXCR7. Die bisherigen Ergebnisse der Expression des CXCR7, sowohl in der Muskulatur, als auch in den C2C12-Zellen, lassen jedoch darauf schließen, dass dieser trotzdem eine wesentliche Rolle im Verlauf der Differenzierung spielt.

### 5.2.4 Die Signalwege geben den Hinweis auf die Funktion des CXCR7

Zur entgültigen Funktionsklärung von CXCR4 und CXCR7 wurden die Signalwege untersucht. Durch Untersuchungen von ÖDEMIS et al. (2010) ist bekannt, dass CXCR7, in Astrozyten in der Lage ist, den MAP-Kinase- und den Proteinkinase C-Signalweg aktiv zu stimulieren. Durch die Ergebnisse von ÖDEMIS et al. (2007) ist gesichert, dass eben diese Signalwege auch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Muskelzellen spielen. Bisher ist jedoch kaum geklärt, welcher Rezeptor genau die Signalwegaktivierungen in C2C12-Zellen vermittelt. Um dies zu klären, erfolgte die Untersuchung der Signalwegaktivierung in Anwesenheit der Rezeptorantagonisten. Hierbei bestätigten sich in den Kontrollen die bisherigen Untersuchungsergebnisse, welche eine Aktivierung des MAP-Kinase und des Proteinkinase C-Signalweges nach der Stimulation mit SDF-1 $\alpha$  (Abb. 4.22, Abb. 4.23) zeigten. Nach Blockierung des CXCR4 mit AMD3100 unterblieb die Signalwegaktivierung in beiden Fällen vollständig (Abb. 4.22, Abb. 4.23). Dies deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen, bei denen die Hemmung der Differenzierung unter pharmakologischer Blockierung und Blockierung mit Hilfe der spezifischen siRNA des CXCR4 vollständig aufgehoben wurde und bestätigt die aktive Rolle des CXCR4 in diesen Entwicklungsphasen. Wie erwartet präsentierte sich das Bild bei der Kontrolle des phosphorylierten Erk1/2 und PKC $\zeta/\lambda$  unter Blockade des CXCR7. Es glich der Kontrolle und zeigte somit, dass die Hemmung des CXCR7 keinerlei Einfluss auf die Aktivierung der Signalwege hat (Abb. 4.22, Abb. 4.23). Somit zeigte sich, dass CXCR7 keine aktive Signalwegaktivierung ausführt und somit eine aktive Rolle in der Skelettmuskeldifferenzierung eher unwahrscheinlich ist. Bei Betrachtung der Literatur und der bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit fällt auf, dass CXCR4 aktiv eine Signaltransduktion von SDF-1 $\alpha$  vermittelt um z.B. Migration und Proliferation zu begünstigen (ÖDEMIS et al. 2007), jedoch auch die Differenzierung von C2C12-Zellen hemmt (vorliegende Ergebnisse). Im Sinne einer regelgerechten Entwicklung ist es erforderlich, dass dieser hemmende Differenzierungseinfluss zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt aufgehoben werden muss. Da CXCR7 keine aktiven Veränderungen an der Signalaktivierung vornimmt (vorliegende Ergebnisse), stellt sich die Frage ob seine Funktion in der Modulation der extrazellulären SDF-1 $\alpha$ -Konzentration besteht. Einige Eigenschaften des CXCR7 und die Besonderheit von Muskelzellen sprechen für eine „Scavenger“-Funktion dieses atypischen Chemokinrezeptors in der Muskulatur. Dazu zählt seine wesentlich höhere Affinität für SDF-1 $\alpha$  (BURNS et al. 2006) und die zunehmende Expression mit Beginn der Differenzierung (Abb. 4.7B). Desweiteren konnte MELCHIONNA et al. (2010) nachweisen, dass C2C12-Zellen in der Lage sind, selbstständig SDF-1 $\alpha$  zu sezernieren und somit ständig eine basale Konzentration dieses Faktors vorhanden ist, welche permanent zu einer Differenzierungshemmung führen würde. Um die Theorie des

Milieuomodulators für CXCR7 zu bestätigen, wurde die Signalwegaktivierung im Zeitverlauf der Differenzierung untersucht. Bei der Stimulation der C2C12-Zellen mit SDF-1 $\alpha$  unter proliferativen Bedingungen zeigte sich die bereits beschriebene Phosphorylierung von Erk1/2. Diese war ebenso nach 24h unter Differenzierungsbedingungen nachweisbar. Nach drei Tagen Differenzierung unterblieb interessanter Weise die Signalwegaktivierung vollständig (Abb. 4.24A), obwohl nach wie vor der CXCR4 konstant exprimiert wird, der CXCR7 jedoch deutlich zugenommen hat. Anschließend erfolgte eine Transfektion von drei Tage differenzierten Zellen mit siRNA. Die Kontrollen zeigten kein aktives Signalverhalten über Erk1/2. Ebenso unterblieb dies, wenn der CXCR4 mit Hilfe spezifischer siRNA gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu veränderte sich das Ergebnis nach einer Blockierung des CXCR7. Ohne diesen war nun wieder eine signifikante Phosphorylierung von Erk1/2 durch SDF-1 $\alpha$  nachweisbar (Abb. 4.24). Dadurch zeigt sich, dass CXCR7 in der Lage ist, durch ein erhöhtes Bindungsvermögen von SDF-1 $\alpha$  die aktive Signalwegvermittlung über CXCR4 zu unterbinden. Dies bietet der bis dahin proliferierenden Muskelzelle nun die Möglichkeit der Differenzierungshemmung durch SDF-1 $\alpha$  zu entgehen und in das Stadium der Differenzierung einzutreten. Dieser Mechanismus der Umgebungsmodulation ist nicht unbekannt. BOLDAJIPOUR et al. (2008) zeigten bereits, dass in Zebrafischen CXCR7 zur Modellierung eines SDF-1 $\alpha$ -Gradienten notwendig ist, um eine zielgerichtete Keimzellwanderung zu ermöglichen. Dass dieser Mechanismus auch in Säugetierzellen existiert, konnte von NAUMANN et al. (2010) an MDCK-Zellen bestätigt werden. Hierbei erfolgt eine stetige Internalisierung des CXCR7, welcher jedoch nicht im Lysosomen recycelt, sondern sofort wieder an der Zelloberfläche exprimiert wurde. Somit ist er stetig in der Lage eine feinabgestimmte Umgebungsmodulierung vorzunehmen. Inwiefern der Mechanismus der Internalisierung auch in Zellen der Muskulatur eine Rolle spielt, konnte in dieser Arbeit nicht analysiert werden und sollte ein weiter Ansatz für zukünftige Untersuchungen sein. Jedoch wurde in dieser Arbeit auch die Oberflächenexpression des CXCR7 untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass der Anteil rein CXCR7+ Zellen im proliferativen Zustand lediglich 2% betrug, bis zum dritten Tag der Differenzierung jedoch auf 11% anstieg (Abb. 4.12D). Dies könnte ein Hinweis auf Muskelzellen sein, welche spezifisch zur Umgebungsmodulierung degradiert werden und deren Verteilung innerhalb der Muskulatur bzw. deren Internalisierungsverhalten des Rezeptors unbedingt untersucht werden sollte.

Neben der „sink“-Funktion für SDF-1 $\alpha$  des CXCR7 innerhalb der Muskelzelldifferenzierung deutete sich noch eine weitere mögliche Aufgabe des CXCR7 an. So werden in der Literatur häufig Heterodimerbildungen zwischen CXCR4 und CXCR7 beschrieben (LEVOYE et al. 2009, HARTMANN et al. 2008), welche das Signalgeschehen des CXCR4 beeinflussen. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass der überwiegende Anteil der

C2C12-Zellen sowohl im proliferativen, als auch im differenzierten Zustand (Abb. 4.12D) beide Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Mit Hilfe einer durchgeführten Immunpräzipitation konnte eine Heterodimerisierung nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Da die Heterodimerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu völlig unterschiedlichen Funktionen führen kann (TERRILLON und BOUVIER 2004), müsste in anschließenden Untersuchungen geklärt werden, ob und inwiefern der CXCR7 zusätzlich einen modellierenden Einfluss auf die Funktion des CXCR4 hat.

### 5.3 CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$ in der mdx-Maus

Im Verlauf eines Lebens kommt es immer wieder zu Läsionen im Bereich der Muskulatur, welche durch regenerative Prozesse ausgeheilt werden. Mittlerweile ist bekannt, dass zwei Arten von Zellen prinzipiell in der Lage sind, Muskelfasern zu regenerieren. Dazu gehören einmal sogenannte Satellitenzellen, welche sich im Bereich der Basallamina der Muskelfasern befinden (STOCKDALE 1997) und in der Lage sind, nach einer Verletzung verschiedene Muskelfasern zu regenerieren (FELDMAN und STOCKDALE 1991). Andererseits existiert ein Zellpool im Knochenmark (CORTI et al. 2002), welcher myogene Marker exprimiert und nach Verletzungen in der Lage ist, in die Muskulatur einzuwandern (PEREZ et al. 2009). Da beide Zelltypen sich im Stadium myogener Vorläuferzellen befinden, und äquivalent zur embryonalen Entwicklung eine Proliferations- und eine Differenzierungsphase durchlaufen müssen, stellte sich die Frage, ob SDF-1 $\alpha$  und seine beiden Rezeptoren an diesem Regenerationsprozess beteiligt sind. Für Untersuchungen an regenerierender Muskulatur wurde in dieser Arbeit die mdx-Maus im Alter von sechs Monaten und die gleichaltrigen Wildtypen als Kontrollen genutzt. Ihre Mutation im Dystrophin-Gen (BULFIELD et al. 1984) führt zu permanenten Phasen der Degeneration und Regeneration im Bereich der Muskulatur. Im Western Blot zeigten sich im Wildtyp kaum detektierbare Level an CXCR4, während CXCR7 (Abb. 4.26 WT), wie bereits in den ersten Analysen (Abb. 4.2), deutlich ausgeprägt war. Im Vergleich dazu zeigte sich ein unerwartet kräftiger Anstieg des CXCR4 in der Muskulatur der mdx-Maus, während CXCR7 gleichbleibend exprimiert wurde (Abb. 4.26 mdx). Dieser Anstieg war vorerst kritisch zu betrachten, da für den Western Blot ein Muskelhomogenat verwendet wurde. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass auf Grund der degenerierenden Muskelfasern vermehrt immunologische Zellen detektiert werden können (CARNWATH und SHOTTON 1987), welche CXCR4+ sind (AIUTI et al. 1999, GOUWY et al. 2011). Eine anschließende immunhistologische Untersuchung ließ erkennen, dass im gefäßnahen Bereich (Daten nicht gezeigt) und zwischen den Muskelfasern Immunzellen nachweisbar waren. Zusätzlich zeigte sich jedoch eine deutliche



## 5. DISKUSSION

---

CXCR4-Färbung auf der Oberfläche der meisten Muskelfasern (Abb. 4.27). Diese Beobachtung spricht für eine aktive Beteiligung des CXCR4 an der Muskelregeneration, welcher durch seine Hochregulation nun erneut in der Lage ist, Muskelzellen für eine ausreichende Muskelregeneration proliferieren zu lassen. Da der CXCR7 unverändert in der mdx-Maus exprimiert wird (Abb. 4.27), stellte sich die Frage, ob SDF-1 $\alpha$  auch bei einer Myopathie einer Hochregulation unterliegt, da GRIFFIN et al. (2010) ansteigende SDF-1 $\alpha$ -Level drei Tage nach einer gesetzten Muskelverletzung fanden. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt, dass auch SDF-1 $\alpha$  in der mdx-Maus deutlich vermehrt exprimiert wird (Abb. 4.28). Da der Ursprung des SDF-1 $\alpha$  nicht vollständig geklärt ist, könnte eine Verletzung der Muskulatur zu einer erhöhten Freisetzung des Faktors aus degenerierenden Muskelzellen führen. Meine Ergebnisse lassen an dieser Stelle keine Aussagen über die Funktion des CXCR7 zu, welcher nur eine lokale Down-Regulation erfahren könnte, die sich der Sensibilität des Western Blots bzw. der Immunhistochemie entzieht. Ebenso bestände die Möglichkeit, dass das vermehrt auftretende SDF-1 $\alpha$  zu einer veränderten Internalisierungsrate des CXCR7 führt (LUKER et al. 2010) und somit ein positives intrazelluläres Feedback für eine gesteigerte CXCR4-Expression an z.B. Satellitenzellen entsteht. Die genaue Aufklärung dieses Mechanismus sollte in weiterführenden Studien eingehender untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

|                                  |                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Verfasser:</b>                | Conny Hunger                                                                                                                                                                   |
| <b>Titel:</b>                    | Die Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 bei der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur der Maus                                                                       |
| <b>Institut:</b>                 | Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig<br>und<br>Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig |
| <b>Eingereicht:</b>              | Juli 2012                                                                                                                                                                      |
| <b>Bibliographische Angaben:</b> | 80 Seiten, 38 Abbildungen, 1 Tabelle, 129 Literaturangaben, 1 Anhang                                                                                                           |
| <b>Schlüsselwörter:</b>          | CXCR4, CXCR7, SDF-1 $\alpha$ , Muskeldifferenzierung, Myogenin, MyHC                                                                                                           |

Das Chemokine SDF-1 $\alpha$  und sein Rezeptor CXCR4 sind in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie der Organogenese, der Hämatopoese und der Immunantwort involviert. Die Entdeckung des alternativen SDF-1 $\alpha$ -Rezeptors CXCR7 bewirkte eine erneute Untersuchung der Funktion des SDF-1-Systems in diesen Vorgängen. CXCR7 ist in der Lage, je nach Gewebe- oder Zelltyp, als „Scavenger“-Rezeptor, Modulator des CXCR4 oder selbstständig aktiver Rezeptor zu agieren. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern beide Rezeptoren im Verlauf der Entwicklung der Muskulatur exprimiert werden, welche Aufgabe sie dabei übernehmen und ob sich Rückschlüsse auf die Muskelregeneration daraus ableiten lassen. Hierfür erfolgten *in vitro*-Untersuchungen an C2C12-Zellen und die anschließende Analyse der Expression von CXCR4, CXCR7 und SDF-1 $\alpha$  in der sich entwickelnden Gliedmaßenmuskulatur von Wildtyp- und mdx-Mäusen. Die Untersuchung von C2C12-Zellen zeigte in allen Differenzierungsstadien eine detektierbare Menge von CXCR4 und eine zunehmende Expression des CXCR7. Die Behandlung der Zellen mit SDF-1 $\alpha$  führte zu einer Phosphorylierung von Erk1/2 und PKC $\zeta/\lambda$  und hemmte gleichzeitig deren Differenzierung. Nach einer Blockierung des CXCR4 mit seinem pharmakologischen Antagonist AMD3100 oder nach Hemmung der Expression durch spezifische siRNA blieb die Aktivierung des Signalweges aus und der hemmende Einfluss des SDF-1 $\alpha$  auf die Differenzierung verschwand vollständig. Im Gegensatz dazu blieben nach der pharmakologischen Blockierung oder durch siRNA vermittelten Expressionshemmung des CXCR7 alle SDF-1 $\alpha$ -induzierten Effekte vollständig erhalten. Eine Untersuchung des Signalweges am dritten Tag der Differenzierung zeigte keine Aktivierung von Erk1/2. Ebenso blieb Erk1/2 nach einer Hemmung der Expression des CXCR4 unphosphoryliert. Im Gegensatz

dazu fand nach einer Hemmung der Expression des CXCR7 mit spezifischer siRNA erneut eine Aktivierung des Signalweges statt. Weiterhin konnte *in vivo* festgestellt werden, dass die Expression des CXCR4 in der Muskulatur während der embryonalen Entwicklung am höchsten ist und bereits kurz nach der Geburt stark abnimmt, wenn die sekundäre Muskelentwicklung abgeschlossen ist. Die Expression des CXCR7 hingegen steigt perinatal an und bleibt bis zum Erwachsenenalter bestehen. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass CXCR4 aktiv das Signalgeschehen von SDF-1 $\alpha$  in der Myogenese vermittelt und somit zur Differenzierungshemmung von Myoblasten beiträgt. CXCR7 hingegen wirkt als passiver SDF-1 $\alpha$ -Scavenger und induziert somit durch eine Modulierung der extrazellulären SDF-1 $\alpha$ -Konzentration die Differenzierung. In Übereinstimmung mit der Rolle des SDF-1 $\alpha$ -Systems bei der Muskelentwicklung, konnte eine kontinuierliche SDF-1 $\alpha$ -Expression im Bindegewebe um pränatale und im Endomysium von postnatalen und adulten Muskelfasern festgestellt werden. Diese SDF-1 $\alpha$ -Expression stieg ebenso wie die CXCR4-Expression bei der Analyse der Muskulatur von dystrophin-defizienten Mäusen an und zeigte somit, dass dieses System auch für die Proliferation von Muskelvorläuferzellen in der regenerativen Muskulatur eine wichtige Rolle spielt. Bemerkenswerter Weise hatte diese Muskeldystrophie keinen Einfluss auf die Expression des CXCR7 und beeinflusst vermutlich dessen Funktion über einen anderen Mechanismus. Durch die offensichtlich enge Kontrolle von Muskelentwicklung und Regeneration durch CXCR4, CXCR7 und deren Liganden SDF-1 $\alpha$ , bilden diese ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für bestimmte Muskelerkrankungen.

## 7 Summary

|                      |                                                                                                                                                                              |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Author:</b>       | Conny Hunger                                                                                                                                                                 |
| <b>Title:</b>        | The function of the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development                                                                                 |
| <b>Institute:</b>    | Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig<br>and<br>Institute of Anatomy, Medical Faculty, University of Leipzig |
| <b>Submitted:</b>    | July 2012                                                                                                                                                                    |
| <b>Bibliography:</b> | 80 pages, 38 figures, 1 table, 129 references, 1 appendix                                                                                                                    |
| <b>Keywords:</b>     | CXCR4, CXCR7, SDF-1 $\alpha$ , muscle cell differentiation, myogenin, myosin heavy chain                                                                                     |

The chemokine, SDF-1 $\alpha$ , and its receptor, CXCR4, are assumed to control a multitude of biological processes such as organogenesis, haematopoiesis, and immune responses. The previous demonstration that SDF-1 $\alpha$  additionally binds to the chemokine receptor, CXCR7, currently urges a re-evaluation of the function of the SDF-1 system in these processes. In fact, depending on the tissue and cell type, CXCR7 either acts as a scavenger receptor, a modulator of CXCR4 or an independent active receptor. This thesis is dedicated to answer the following questions: Are both SDF-1 $\alpha$  receptors expressed during muscle development? What is the actual function of these receptors during myogenesis? Is there a role of the SDF-1 system in muscle regeneration? To address these issues both *in vitro* studies with the myoblast cell line, C2C12, as well as *in vivo* analyses on the expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 $\alpha$  in developing and regenerating limb muscles have been performed. At all stages of differentiation, C2C12 cells exhibited measurable amounts of CXCR4. In addition, in the course of differentiation C2C12 cells showed increasing expression levels of CXCR7. Treatment of the cells with SDF-1 $\alpha$  resulted in the phosphorylation of Erk1/2 and PKC $\zeta$ / $\lambda$  and subsequently blocked their myogenic differentiation. Following inactivation of CXCR4 either by its antagonist, AMD3100, or by specific siRNA, SDF-1 $\alpha$  failed to activate both pathways and in addition no longer inhibited the myogenic differentiation of C2C12 cells. By contrast, inactivation of CXCR7 remained without effects on SDF-1 $\alpha$ -induced cell signalling and resulting inhibitory effects on myogenic differentiation. Interestingly, SDF-1 $\alpha$  also failed to activate Erk1/2 signalling in differentiated C2C12 cells. Cell signalling in differentiated C2C12 cells was, however, restored following inhibition of CXCR7 expression, but not following inhibition of CXCR4 expression. The *in vivo* analysis further revealed that in limb muscles expression of the CXCR4 is highest during embryonic development with a decrease in expression levels shortly after birth when secondary muscle development is completed. Vice versa, expression levels of CXCR7

## 7. SUMMARY

---

increased perinatally and remained high into adulthood.

In summary, these findings unravel that CXCR4 actively mediates SDF-1 $\alpha$ -signalling during myogenesis. The findings further provide evidence that CXCR7 acts as a scavenger receptor during myogenesis which controls myogenic differentiation by modulating extracellular SDF-1 $\alpha$  concentration. In further agreement with a major role of SDF-1 $\alpha$  in muscle development, SDF-1 $\alpha$  is continuously expressed by the endomysium of postnatal and adult muscle fibers. Moreover, expression of SDF-1 $\alpha$  as well as CXCR4 is massively increased in muscles of dystrophin-deficient mice further implying that the SDF-1 system plays an equally important role during muscle development and regeneration. The pivotal role of SDF-1 $\alpha$  in muscle development and regeneration points to the SDF-1 system as a promising therapeutical target for certain muscle diseases.

# Literaturverzeichnis

- Aiuti A, Tavian M, Cipponi A, Ficara F, Zappone E, Hoxie J, Peault B, Bordignon C. Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lymphohematopoietic progenitors. *Eur J Immunol.* 1999;29(6):1823–1831.
- Amthor H, Christ B, Patel K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development.* 1999;126(5):1041–1053.
- Amthor H, Christ B, Weil M, Patel K. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol.* 1998;8(11):642 – 652.
- Andrés V, Walsh K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol.* 1996;132(4):657–666.
- Aoyama H, Asamoto K. Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. *Development.* 1988;104(1):15–28.
- Bader D, Masaki T, Fischman DA. Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *J Cell Biol.* 1982;95(3):763–770.
- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998;392(6676):565–568.
- Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem.* 2001;77(5):1226–1236.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005;280(42):35760–35766.
- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *PNAS.* 1998;95(26):15603–15607.
- Beider K, Begin M, Abraham M, Wald H, Weiss ID, Wald O, Pikarsky E, Zeira E, Eizenberg O, Galun E, Hardan I, Engelhard D, Nagler A, Peled A. CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003 inhibits leukemia and multiple myeloma tumor growth. *Exp Hematol.* 2011;39(3):282 – 292.
- Bennett AM, Tonks NK. Regulation of Distinct Stages of Skeletal Muscle Differentiation by Mitogen-Activated Protein Kinases. *Science.* 1997;278(5341):1288–1291.

- Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(6):725 – 730.
- Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 1998;8(10):404 – 410.
- Bischoff R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 1990;111(1):201–207.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursors cells into the limb bud. *Nature.* 1995;376(6543):768–771.
- Blau HM, Chiu CP, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell.* 1983;32(4):1171 – 1180.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 1996;382(6594):829–833.
- Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q, Raz E. Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration. *Cell.* 2008;132(3):463 – 473.
- Borycki A, Brunk B, Tajbakhsh S, Buckingham M, Chiang C, Emerson C. Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development.* 1999;126(18):4053–4063.
- Borycki AG, Strunk KE, Savary R, Emerson CP. Distinct Signal/Response Mechanisms Regulate pax1 and QmyoD Activation in Sclerotomal and Myotomal Lineages of Quail Somites. *Dev Biol.* 1997;185(2):185 – 200.
- Brand-Saberi B, Christ B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res.* 1999;296:199–212.
- Brand-Saberi B, Christ B. Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol.* 2000;48:1–42.
- Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C. The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development.* 2000;127(2):437–445.
- Broxmeyer H. Regulation of Hematopoiesis by Chemokine Family Members. *Int J Hematol.* 2001;74:9–17.

- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 2003;202(1):59–68.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(4):1189–1192.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203(9):2201–2213.
- Cabane C, Englaro W, Yeow K, Ragno M, Dérijard B. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 $\gamma$  pathway. *Am J Physiol.* 2003;284(3):C658–C666.
- Carnwath JW, Shotton DM. Muscular dystrophy in the mdx mouse: Histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci.* 1987;80(1):39 – 54.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(1):16 – 42.
- Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003;163(5):1133–1143.
- Christ B, Ordahl CP. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl).* 1995;191:381–396.
- Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR. The Mitogenic and Myogenic Actions of Insulin-like Growth Factors Utilize Distinct Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6653–6662.
- Corti S, Strazzer S, Bo RD, Salani S, Bossolasco P, Fortunato F, Locatelli F, Soligo D, Moggio M, Ciscato P, Prella A, Borsotti C, Bresolin N, Scarlato G, Comi GP. A Subpopulation of Murine Bone Marrow Cells Fully Differentiates along the Myogenic Pathway and Participates in Muscle Repair in the mdx Dystrophic Mouse. *Exp Cell Res.* 2002;277(1):74 – 85.
- Cossu G, Kelly R, Tajbakhsh S, Di Donna S, Vivarelli E, Buckingham M. Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development.* 1996;122(2):429–437.



- Dangain J, Vrbova G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve*. 1984;7(9):700–704.
- De Clercq E. Molecular Targets for Antiviral Agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(1):1–10.
- Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr Neurol*. 2007;36(1):1 – 7.
- Dilworth FJ, Blais A. Epigenetic regulation of satellite cell activation during muscle regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2011;2(2):18.
- Duprez D. Signals regulating muscle formation in the limb during embryonic development. *Int J Dev Biol*. 2002;46:915 – 925.
- Federspiel B, Melhado IG, Duncan AMV, Delaney A, Schappert K, Clark-Lewis I, Jirik FR. Molecular Cloning of the cDNA and Chromosomal Localization of the Gene for a Putative Seven-Transmembrane Segment (7-TMS) Receptor Isolated from Human Spleen. *Genomics*. 1993;16(3):707 – 712.
- Feldman JL, Stockdale FE. Skeletal muscle satellite cell diversity: Satellite cells form fibers of different types in cell culture. *Dev Biol*. 1991;143(2):320 – 334.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science*. 1996;272(5263):872–877.
- Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *genesis*. 2008;46(5):235–245.
- Gilmore IR, Fox SP, Hollins AJ, Sohail M, Akhtar S. The Design and Exogenous Delivery of siRNA for Post-transcriptional Gene Silencing. *J Drug Target*. 2004;12(6):315–340.
- Gouwy M, Struyf S, Berghmans N, Vanormelingen C, Schols D, Van Damme J. CXCR4 and CCR5 ligands cooperate in monocyte and lymphocyte migration and in inhibition of dual-tropic (R5/X4) HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2011;41(4):963–973.
- Griffin CA, Apponi LH, Long KK, Pavlath GK. Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J Cell Sci*. 2010;123(18):3052–3060.

- Grymula K, Tarnowski M, Wysoczynski M, Drukala J, Barr FG, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer*. 2010;127(11):2554–2568.
- Göttle P, Kremer D, Jander S, Ödemis V, Engele J, Hartung HP, Küry P. Activation of CXCR7 receptor promotes oligodendroglial cell maturation. *Ann Neurol*. 2010;68(6):915–924.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999;401(6751):390–394.
- Halevy O, Cantley LC. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. *Exp Cell Res*. 2004;297(1):224 – 234.
- Hannon K, Kudla AJ, McAvoy MJ, Clase KL, Olwin BB. Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development through autocrine and paracrine mechanisms. *J Cell Biol*. 1996;132(6):1151–1159.
- Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol*. 2008;84(4):1130–1140.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):534–551.
- Hoffman EP, Jr RHB, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51(6):919 – 928.
- Huang R, Christ B. Origin of the epaxial and hypaxial myotome in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)*. 2000;202:369–374.
- Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and Regulation of the Orphan Receptor RDC1 and Its Putative Ligand in Human Dendritic and B Cells. *J Immunol*. 2006;176(4):2197–2207.
- Itoh N, Mima T, Mikawa T. Loss of fibroblast growth factor receptors is necessary for terminal differentiation of embryonic limb muscle. *Development*. 1996;122(1):291–300.

- Jagla K, Dollé P, Mattei MG, Jagla T, Schuhbaur B, Dretzen G, Bellard F, Bellard M. Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes. *Mech Dev.* 1995;53(3):345 – 356.
- Jansohn M, Hrsg. *Gentechnische Methoden*. 4. Aufl. Elsevier; 2007.
- Johnson RL, Laufer E, Riddle RD, Tabin C. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell.* 1994;79(7):1165 – 1173.
- Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 Is a CXCR7 Ligand with Allosteric Agonist Properties. *Mol Pharmacol.* 2009;75(5):1240–1247.
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–685.
- Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell.* 1991;66(2):305 – 315.
- Law NM, Rosenzweig SA. Characterization of the G-Protein-Linked Orphan Receptor GPRN1/RDC1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201(1):458 – 465.
- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood.* 2009;113(24):6085–6093.
- Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol.* 2008;84(2):116 – 131.
- Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene.* 2010;29(32):4599–4610.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(16):9448–9453.
- Maroto M, Reshef R, Münsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB. Ectopic Pax-3 Activates MyoD and Myf-5 Expression in Embryonic Mesoderm and Neural Tissue. *Cell.* 1997;89:139–148.

- Matsumura K, Ohlendieck K, Ionasescu VV, Tomé FM, Nonaka I, Burghes AH, Mora M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP. The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromusc Disord.* 1993;3(5-6):533 – 535.
- Melchionna R, Di Carlo A, De Mori R, Cappuzzello C, Barberi L, Musara A, Cencioni C, Fujii N, Tamamura H, Crescenzi M, Capogrossi MC, Napolitano M, Germani A. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors. *Muscle Nerve.* 2010;41(6):828–835.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40):15735–15740.
- Molkentin JD, Olson EN. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genetics Dev.* 1996;6(4):445 – 453.
- Moser H. Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet.* 1984;66:17–40.
- Mulisch M, Welsch U, Hrsg. *Mikroskopische Technik.* 18. Aufl. Spektrum; 2010.
- Münsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 1995;9(23):2911–2922.
- Muntoni F, Mateddu A, Marchei F, Clerk A, Serra G. Muscular weakness in the mdx mouse. *J Neurol Sci.* 1993;120(1):71 – 77.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):145–176.
- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(6):2305–2309.
- Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul C, Yoshie O, Matsushima K, Yoshida N, Springer T, Kishimoto T. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(25):14726–14729.

- Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9175.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996;382(6594):833–835.
- Ödemis V, Boosmann K, Dieterlen MT, Engele J. The chemokine SDF1 controls multiple steps of myogenesis through atypical PKC $\zeta$ . *J Cell Sci*. 2007;120(22):4050–4059.
- Ödemis V, Boosmann K, Heinen A, Kury P, Engele J. CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *J Cell Sci*. 2010;123(7):1081–1088.
- Ödemis V, Lamp E, Pezeshki G, Moepps B, Schilling K, Gierschik P, Littman DR, Engele J. Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2005;30(4):494 – 505.
- Ödemis V, Lipfert J, Kraft R, Hajek P, Abraham G, Hattermann K, Mentlein R, Engele J. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through Gi/o proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*. 2012;60(3):372–381.
- Ontell M, Kozeka K. The organogenesis of murine striated muscle: A cytoarchitectural study. *Am J Anat*. 1984;171(2):133–148.
- Ontell M, Ontell M, Sopper M, Mallonga R, Lyons G, Buckingham M. Contractile protein gene expression in primary myotubes of embryonic mouse hindlimb muscles. *Development*. 1993;117(4):1435–1444.
- Ott M, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*. 1991;111(4):1097–1107.
- Pastoret C, Sebille A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci*. 1995;129(2):97 – 105.
- Pease JE, Murphy PM. Microbial corruption of the chemokine system: An expanding paradigm. *Sem Immunol*. 1998;10(3):169 – 178.
- Perez AL, Bachrach E, Illigens BMW, Jun SJ, Bagden E, Steffen L, Flint A, McGowan FX, del Nido P, Montecino-Rodriguez E, Tidball JG, Kunkel LM. CXCR4 enhances engraftment of muscle progenitor cells. *Muscle Nerve*. 2009;40(4):562–572.

- Perry RL, Rudnicki MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci.* 2000;5:d750–767.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ.  $\beta$ -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(2):628–632.
- Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1985;318(6047):672–675.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90(3):909–928.
- Ross J, Duxson M, Harris A. Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles. *Development.* 1987;100(3):383–394.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 1993;75(7):1351 – 1359.
- Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 2000;57(1):16–25.
- Sachs M, Brohmann H, Zechner D, Müller T, Hülsken J, Walther I, Schaeper U, Birchmeier C, Birchmeier W. Essential Role of Gab1 for Signaling by the C-Met Receptor in Vivo. *J Cell Biol.* 2000;150(6):1375–1384.
- Sarker KP, Lee KY. L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway. *Oncogene.* 2004;23(36):6064–6070.
- Sassoon DA. Myogenic Regulatory Factors: Dissecting Their Role and Regulation during Vertebrate Embryogenesis. *Dev Biol.* 1993;156(1):11 – 23.
- Scaal M, Bonafede A, Dathe V, Sachs M, Cann G, Christ B, Brand-Saberi B. SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development.* 1999;126(21):4885–4893.
- Schäfer K, Braun T. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene. *Nat Genet.* 1999;23(2):213–216.
- Schönemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol.* 2008;510(2):207–220.

Shadrach JL, Wagers AJ. Stem cells for skeletal muscle repair. *Philos Trans R Soc London [Biol]*. 2011;366(1575):2297–2306.

Sierro F, Biben C, Martínez-Muñoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martínez-A C, Mackay CR, Mackay F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14759–14764.

Stern H, Brown A, Hauschka S. Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. *Development*. 1995;121(11):3675–3686.

Stockdale FE. Mechanisms of Formation of Muscle Fiber Types. *Cell Struct Funct*. 1997;22:37–43.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995;270(45):27348–27357.

Strle K, MCusker RH, Tran L, King A, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Novel activity of an anti-inflammatory cytokine: IL-10 prevents TNF[alpha]-induced resistance to IGF-I in myoblasts. *J Neuroimmunol*. 2007;188(1-2):11–55.

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa Si, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998;393(6685):591–594.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. Redefining the Genetic Hierarchies Controlling Skeletal Myogenesis: Pax-3 and Myf-5 Act Upstream of MyoD. *Cell*. 1997;89(1):127 – 138.

Teillet M, Watanabe Y, Jeffs P, Duprez D, Lapointe F, Le Douarin N. Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development*. 1998;125(11):2019–2030.

Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*. 2004;5(1):30–34.

- Torres LFB, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. *Brain*. 1987;110(2):269–299.
- Tortorella LL, Milasincic DJ, Pilch PF. Critical Proliferation-independent Window for Basic Fibroblast Growth Factor Repression of Myogenesis via the p42/p44 MAPK Signaling Pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(17):13709–13717.
- Vasyutina E, Stebler J, Brand-Saberi B, Schulz S, Raz E, Birchmeier C. CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev*. 2005;19(18):2187–2198.
- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS. The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(7):4283–4294.
- Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977;270(5639):725–727.
- Yahiaoui L, Gvozdic D, Danialou G, Mack M, Petrof BJ. CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury. *J Physiol (Lond)*. 2008;586(16):3991–4004.
- Yang X, Vogan K, Gros P, Park M. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development*. 1996;122(7):2163–2171.
- Yusuf F, Rehimi R, Dai F, Brand-Saberi B. Expression of chemokine receptor CXCR4 during chick embryo development. *Anat Embryol (Berl)*. 2005;210:35–41.
- Zabel BA, Wang Y, Lewén S, Berahovich RD, Penfold MET, Zhang P, Powers J, Summers BC, Miao Z, Zhao B, Jalili A, Janowska-Wieczorek A, Jaen JC, Schall TJ. Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands. *J Immunol*. 2009;183(5):3204–3211.
- Zhang L, Ran L, Garcia GE, Wang XH, Han S, Du J, Mitch WE. Chemokine CXCL16 Regulates Neutrophil and Macrophage Infiltration into Injured Muscle, Promoting Muscle Regeneration. *Am J Pathol*. 2009;175(6):2518 – 2527.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121 – 127.



Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595–599.

# A Anhang

## A.1 Daten zur Quantitativen Analyse

Mittelwert = MW, Standardabweichung = SD

| CXCR4 | MW   | SD   | CXCR7 | MW   | SD   |
|-------|------|------|-------|------|------|
| E18   | 5,80 | 2,40 | E18   | 0,88 | 0,28 |
| P3    | 1,03 | 0,51 | P3    | 1,34 | 0,19 |
| P16   | 0,68 | 0,46 | P16   | 1,50 | 0,38 |
| Adult | 0,13 | 0,07 | Adult | 1,58 | 0,55 |

Tabelle A.1: Daten Abb. 4.4B: CXCR4- und CXCR7- Expression *in vivo*.

| CXCR4    | MW   | SD   | CXCR7    | MW   | SD   |
|----------|------|------|----------|------|------|
| Prolif.  | 1,00 | 0,00 | Prolif.  | 1,00 | 0,00 |
| 1d Diff. | 1,12 | 0,04 | 1d Diff. | 1,92 | 0,73 |
| 2d Diff. | 0,88 | 0,27 | 2d Diff. | 1,92 | 0,70 |
| 3d Diff. | 0,95 | 0,10 | 3d Diff. | 2,63 | 0,55 |

Tabelle A.2: Daten Abb. 4.8: Expression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen.

| CXCR4    | MW   | SD   | CXCR7    | MW   | SD   |
|----------|------|------|----------|------|------|
| Prolif.  | 1,05 | 0,02 | Prolif.  | 1,07 | 0,04 |
| 2d Diff. | 0,96 | 0,12 | 2d Diff. | 1,46 | 0,16 |
| 3d Diff. | 1,03 | 0,28 | 3d Diff. | 3,00 | 0,30 |

Tabelle A.3: Daten Abb. 4.9: FACS-Analyse von CXCR4 und CXCR7 im Differenzierungsverlauf.

| CXCR4+/CXCR7+ | MW    | SD   | CXCR4+/CXCR7- | MW    | SD   | CXCR4-/CXCR7+ | MW    | SD   |
|---------------|-------|------|---------------|-------|------|---------------|-------|------|
| Prolif.       | 48,67 | 1,78 | Prolif.       | 30,33 | 3,11 | Prolif.       | 2,33  | 1,11 |
| 2d Diff.      | 55,33 | 6,22 | 2d Diff.      | 14,67 | 1,78 | 2d Diff.      | 2,67  | 1,11 |
| 3d Diff.      | 68,67 | 1,78 | 3d Diff.      | 7,33  | 0,89 | 3d Diff.      | 10,67 | 0,89 |

Tabelle A.4: Daten Abb. 4.12: FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen.

| Myogenin                 | MW   | SD   | MyHC                     | MW   | SD   |
|--------------------------|------|------|--------------------------|------|------|
| 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,55 | 0,27 | 0,1 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,86 | 0,09 |
|                          |      |      | 1,0 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,69 | 0,10 |
|                          |      |      | 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 0,48 | 0,13 |
|                          |      |      | 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,26 | 0,12 |

**Tabelle A.5: Daten Abb. 4.14: Quantitative Analyse des Einflusses von SDF-1 $\alpha$ .**

| Myogenin  | MW   | SD   | MyHC      | MW   | SD   |
|-----------|------|------|-----------|------|------|
| Kontrolle | 1,00 | 0,00 | Kontrolle | 1,00 | 0,00 |
| AMD3100   | 0,99 | 0,24 | AMD3100   | 1,10 | 0,36 |
| CCX733    | 0,99 | 0,33 | CCX733    | 0,92 | 0,32 |
| CCX771    | 0,87 | 0,26 | CCX771    | 1,14 | 0,25 |

**Tabelle A.6: Daten Abb. 4.16: Wirkung von AMD3100, CCX733 und CCX771 auf die Myogenin- und MyHC-Expression.**

| Myogenin                           | MW   | SD   |
|------------------------------------|------|------|
| 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$             | 1,00 | 0,00 |
| 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$            | 0,50 | 0,28 |
| 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$           | 0,41 | 0,21 |
| AMD3100 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| AMD3100 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 1,72 | 0,61 |
| AMD3100 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,93 | 0,25 |
| CCX733 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00 | 0,00 |
| CCX733 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 0,71 | 0,53 |
| CCX733 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 0,40 | 0,31 |

**Tabelle A.7: Daten Abb. 4.17: Quantitative Analyse der Wirkung von CXCR4 und CXCR7 auf die Myogeninexpression.**

| MyHC                               | MW   | SD   |
|------------------------------------|------|------|
| 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$             | 1,00 | 0,00 |
| 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$            | 0,45 | 0,21 |
| 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$           | 0,32 | 0,13 |
| AMD3100 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| AMD3100 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 1,31 | 0,60 |
| AMD3100 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 1,30 | 0,48 |
| CCX733 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00 | 0,00 |
| CCX733 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 0,71 | 0,38 |
| CCX733 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 0,25 | 0,15 |

**Tabelle A.8: Daten Abb. 4.18: Quantitative Analyse der Wirkung von CXCR4 und CXCR7 auf die MyHC-Expression.**

| Myogenin                                     | MW   | SD   |
|----------------------------------------------|------|------|
| Kontroll-siRNA + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$      | 1,00 | 0,00 |
| Kontroll-siRNA + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 0,36 | 0,17 |
| 50 nM siRNA CXCR4 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| 50 nM siRNA CXCR4 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 1,01 | 0,26 |
| 40 nM siRNA CXCR7 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| 40 nM siRNA CXCR7 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,37 | 0,19 |

**Tabelle A.9: Daten Abb. 4.20: Quantitative Analyse zur Myogeninexpression in siRNA-transfizierten C2C12-Zellen.**

| MyHC                                         | MW   | SD   |
|----------------------------------------------|------|------|
| Kontroll-siRNA + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$      | 1,00 | 0,00 |
| Kontroll-siRNA + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 0,35 | 0,20 |
| 50 nM siRNA CXCR4 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| 50 nM siRNA CXCR4 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 1,02 | 0,34 |
| 40 nM siRNA CXCR7 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| 40 nM siRNA CXCR7 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,29 | 0,19 |

**Tabelle A.10: Daten Abb. 4.21: Quantitative Analyse zur und MyHC-Expression in transfizierten C2C12-Zellen.**

| Erk1/2                             | MW   | SD   |
|------------------------------------|------|------|
| 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$             | 1,00 | 0,00 |
| 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$            | 1,42 | 0,30 |
| 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$           | 2,59 | 0,66 |
| AMD3100 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| AMD3100 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 0,96 | 0,40 |
| AMD3100 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,98 | 0,30 |
| CCX771 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00 | 0,00 |
| CCX771 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,17 | 0,40 |
| CCX771 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 1,99 | 0,39 |

**Tabelle A.11: Daten Abb. 4.22: Quantitative Analyse zum Signalmolekül Erk1/2 unter dem Einfluss von AMD3100 und CCX771.**

| PKC $\zeta/\lambda$                | MW   | SD   |
|------------------------------------|------|------|
| 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$             | 1,00 | 0,00 |
| 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$            | 1,21 | 0,45 |
| 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$           | 2,56 | 0,54 |
| AMD3100 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,00 | 0,00 |
| AMD3100 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 0,87 | 0,44 |
| AMD3100 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,72 | 0,21 |
| CCX771 + 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00 | 0,00 |
| CCX771 + 10 ng/ml SDF-1 $\alpha$   | 1,88 | 0,60 |
| CCX771 + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 2,37 | 0,56 |

**Tabelle A.12: Daten Abb. 4.23: Quantitative Analyse zum Signalmolekül PKC $\zeta/\lambda$  unter dem Einfluss von AMD3100 und CCX771.**

| Erk1/2             |                           | MW   | SD   |
|--------------------|---------------------------|------|------|
| Proliferation      | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00 | 0,00 |
|                    | 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 2,93 | 0,42 |
| 1d Differenzierung | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 2,56 | 0,54 |
|                    | 1000 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 2,72 | 0,49 |
| 3d Differenzierung | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00 | 0,00 |
|                    | 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 1,24 | 0,45 |

**Tabelle A.13: Daten Abb. 4.24: Signalmolekül Erk1/2 im Verlauf der Proliferation und Differenzierung.**

| <b>Erk1/2</b>  |                           | <b>MW</b> | <b>SD</b> |
|----------------|---------------------------|-----------|-----------|
| Kontroll-siRNA | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 1,00      | 0,00      |
|                | 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 0,97      | 0,24      |
| CXCR4 siRNA    | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 0,99      | 0,17      |
|                | 1000 ng/ml SDF-1 $\alpha$ | 0,96      | 0,22      |
| CXCR7 siRNA    | 0 ng/ml SDF-1 $\alpha$    | 0,98      | 0,15      |
|                | 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$  | 2,03      | 0,72      |

**Tabelle A.14: Daten Abb. 4.25: Signalmolekül Erk1/2 in siRNA-transfizierten Zellen nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen.**



# Abbildungsverzeichnis

|      |                                                                                                    |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1  | Embryonaler Ursprung der Muskulatur . . . . .                                                      | 3  |
| 2.2  | Rolle der MRFs . . . . .                                                                           | 6  |
| 2.3  | Zusammenfassung der Skelettmuskelentwicklung in der Gliedmaße . . . . .                            | 6  |
| 2.4  | Einteilung der Chemokine . . . . .                                                                 | 8  |
| 2.5  | Aufbau eines GPCR . . . . .                                                                        | 8  |
| 2.6  | Kultivierte mehrkernige Muskelfasern . . . . .                                                     | 14 |
| 3.1  | PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) . . . . .                                    | 24 |
| 3.2  | Aufbau des Blot-Sandwiches während des Transfers . . . . .                                         | 25 |
| 3.3  | Auswertung FACS . . . . .                                                                          | 30 |
| 3.4  | Auswertung FACS . . . . .                                                                          | 30 |
| 4.1  | CXCR4- Expression <i>in vivo</i> . . . . .                                                         | 37 |
| 4.2  | CXCR7- Expression <i>in vivo</i> . . . . .                                                         | 39 |
| 4.3  | Verteilung des SDF-1 $\alpha$ in der Muskulatur . . . . .                                          | 40 |
| 4.4  | CXCR4- und CXCR7- Expression <i>in vivo</i> . . . . .                                              | 41 |
| 4.5  | PCR zu CXCR4 und CXCR7 . . . . .                                                                   | 42 |
| 4.6  | Verhalten von C2C12-Zellen nach Serumdeprivation (Nativaufnahme 10x) . . . . .                     | 43 |
| 4.7  | Expression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen . . . . .                                           | 44 |
| 4.8  | Statistik zur Expression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen . . . . .                             | 44 |
| 4.9  | FACS-Analyse von CXCR4 und CXCR7 im Differenzierungsverlauf . . . . .                              | 45 |
| 4.10 | Immunzytochemische Färbung von CXCR4 und CXCR7 (Proliferationsbedingungen, 20x) . . . . .          | 46 |
| 4.11 | Immunzytochemische Färbung von CXCR4 und CXCR7 (Differenzierungsbedingungen, 20x) . . . . .        | 47 |
| 4.12 | Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 und CXCR7 in C2C12-Zellen mit Hilfe der FACS . . . . . | 48 |
| 4.13 | Immunpräzipitation der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 . . . . .                                        | 49 |
| 4.14 | Einfluss von SDF-1 $\alpha$ auf die Myogenin- und MyHC-Expression . . . . .                        | 50 |
| 4.15 | Immunzytochemischer Nachweis des Einflusses von SDF-1 $\alpha$ auf die MyHC-Expression . . . . .   | 51 |
| 4.16 | Wirkung von AMD3100, CCX733 und CCX771 auf die MyHC- und Myogenin-Expression . . . . .             | 52 |
| 4.17 | Wirkung von CXCR4 und CXCR7 auf die Myogeninexpression und Quantitative Analyse . . . . .          | 53 |
| 4.18 | Wirkung von CXCR4 und CXCR7 auf die MyHC-Expression und Quantitative Analyse . . . . .             | 54 |



|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.19 Kontrolle der Hemmung der Rezeptorexpression durch spezifische siRNA . .                                       | 55 |
| 4.20 Myogeninexpression in siRNA-transfizierten C2C12-Zellen. . . . .                                               | 56 |
| 4.21 MyHC-Expression in siRNA-transfizierten C2C12-Zellen. . . . .                                                  | 57 |
| 4.22 Untersuchung des Signalmoleküls Erk1/2 unter Blockierung von CXCR4<br>und CXCR7 . . . . .                      | 59 |
| 4.23 Untersuchung des Signalmoleküls PKC $\zeta$ / $\lambda$ unter Blockierung von CXCR4<br>und CXCR7 . . . . .     | 60 |
| 4.24 Signalmolekül Erk1/2 unter Proliferations- und Differenzierungsbedingungen                                     | 61 |
| 4.25 Signalmolekül Erk1/2 in transfizierten Zellen nach drei Tagen unter Diffe-<br>renzierungsbedingungen . . . . . | 62 |
| 4.26 Expression von CXCR4 und CXCR7 bei Wildtyp (WT)- und mdx-Mäusen<br>im Vergleich . . . . .                      | 63 |
| 4.27 Immunhistochemischer Nachweis der CXCR4 und CXCR7 Expression in<br>Wildtyp (WT)- und mdx-Mäusen . . . . .      | 65 |
| 4.28 Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 $\alpha$ bei Wildtyp (WT)- und mdx-<br>Mäusen . . . . .                | 66 |

# Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Fluorochrome . . . . .                                                                                                        | 29 |
| A.1 Daten Rezeptoren <i>in vivo</i> . . . . .                                                                                     | 93 |
| A.2 Daten Rezeptoren in C2C12-Zellen . . . . .                                                                                    | 93 |
| A.3 Daten zur FACS der Rezeptoren . . . . .                                                                                       | 93 |
| A.4 Daten zur FACS der Oberflächenexpression der Rezeptoren . . . . .                                                             | 93 |
| A.5 Daten zum Einfluss von SDF-1 $\alpha$ . . . . .                                                                               | 94 |
| A.6 Daten zur Wirkung der pharmakologischen Hemmer . . . . .                                                                      | 94 |
| A.7 Daten zur Rezeptorwirkung auf Myogenin . . . . .                                                                              | 94 |
| A.8 Daten zur Rezeptorwirkung auf MyHC . . . . .                                                                                  | 95 |
| A.9 Daten zur Rezeptorwirkung auf die Differenzierung nach Transfektion . . . . .                                                 | 95 |
| A.10 Daten zur Rezeptorwirkung auf die Differenzierung nach Transfektion . . . . .                                                | 95 |
| A.11 Daten zur Signalwegaktivierung unter dem Einfluss von AMD3100 und<br>CCX771 . . . . .                                        | 96 |
| A.12 Daten zur Signalwegaktivierung unter dem Einfluss von AMD3100 und<br>CCX771 . . . . .                                        | 96 |
| A.13 Daten zur Signalwegaktivierung in Proliferation und Differenzierung . . . . .                                                | 96 |
| A.14 Daten zum Signalmolekül Erk1/2 in siRNA-transfizierten Zellen nach drei<br>Tagen unter Differenzierungsbedingungen . . . . . | 97 |



## **Posterpräsentation**

Research Festival for Life Science 2010:

Hunger C, Ödemis V, Engele J

The SDF-1 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, exert dual roles during limb myogenesis

## **Publikation**

Conny Hunger, Veysel Ödemis, Jürgen Engele

Expression and function of the SDF-1 chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development and regeneration

Experimental Cell Research, 2012 Oct 15;318(17):2178-90, DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.06.020

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Engele bedanken, welcher mir dieses Thema anvertraute und mich in seiner Arbeitsgruppe das wissenschaftliche Arbeiten lernen ließ. Ebenso bei Herrn Prof. Dr. Seeger, welcher die veterinärmedizinische Betreuung übernahm und mir somit den Dr. vet. med. überhaupt erst ermöglichte.

Weiterhin Danke ich Dr. Veysel Ödemis für die tatkräftige Unterstützung beim Erlernen aller Methoden und der täglichen Arbeit im Labor und der Zellkultur. Nicht zu vergessen, die immer wieder anregenden und vorantreibenden fachlichen Diskussionen und die kleinen Späße zur Aufmunterung in Krisenzeiten.

Großer Dank gilt ebenso Nicole Lakowa und Jana Lipfert für die tatkräftige Unterstützung, die tolle Arbeitsatmosphäre und dafür, dass ihr mir mit Rat und Tat zu Seite standet und der Laboralltag nie langweilig wurde.

Dank gilt auch Ulla Grabiec. Die tollen Aufnahmen am LSM hätte ich ohne dich nie so hinbekommen.

Auch Carolin Karnath möchte ich an dieser Stelle nicht vergessen zu danken. Du warst meine Vorreiterin in allen verwaltungstechnischen Dingen und unsere lustigen (und meist auch konstruktiven) Zusammentreffen möchte ich bis heute nicht missen.

Ein ganz besonders großer Dank geht an meine Familie. Ihr habt mir das Studium der Tiermedizin ermöglicht und damit den Grundstein für diese Arbeit gelegt. Und natürlich war eure Unterstützung in allen Lebenslagen unentbehrlich.

Zum Schluss möchte ich mich bei einem ganz besonderen Menschen bedanken, meinem Freund Marco Braun. Ohne deine aufmunternden Worte, dein technisches Verständnis und deinem, trotz aller Heulerei, unerschütterlichem Wesen wäre ich nie soweit gekommen. Ich liebe dich!